

Aus der Medizinischen Poliklinik - Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München

ehem. Direktor: Prof. Dr. D. Schlöndorff
komm. Direktor: Prof. Dr. M. Reincke

**Humane peritoneale Adipozyten
synthetisieren antimikrobiell wirksame Peptide (α -Defensine)**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Paslakis Georgios
aus
Thessaloniki, Griechenland
2008

Meinen Eltern

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. D. Schlöndorff

Mitberichterstatter: Prof. Dr. A. Wagner
Priv. Doz. W. Fischer

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. C. Keuneke
Dekan: Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 28.02.2008

Humane peritoneale Adipozyten synthetisieren antimikrobiell wirksame Peptide (α -Defensine)

	Seite
1. Antimikrobielle Peptide	6
1.1 Allgemeines zu angeborenem Immunsystem und antimikrobiellen Peptiden.....	6
1.2 Gruppen antimikrobieller Peptide.....	7
1.3 Familien antimikrobieller Peptide beim Menschen.....	7
1.3.1 Defensine.....	7
1.3.1.1 α -Defensine.....	9
1.3.1.2 β -Defensine.....	9
1.3.2 Kathelicidine LL-37/hCAP-18.....	9
1.4 Verwendung von antimikrobiellen Peptiden als Pharmaka: klinische Studien.....	10
 2. Defensine	 10
2.1 Defensinsynthese.....	10
2.2 Regulation der Defensinsynthese und -freisetzung.....	13
2.3 Wirkungsmechanismus.....	13
2.4 Weitere Defensinaktivitäten.....	16
2.5 Defensinwirksamkeit.....	17
2.6 Beziehung zur Pathogenese von Erkrankungen.....	20
 3. Das Fettgewebe	 21
 4. Ziel der Studie	 22
 5. Material und Methoden	 24
5.1 Material (Granulozyten, Duodenum, Omentum).....	24
5.2 Granulozytenisolierung.....	24
5.3 Isolierung von Adipozyten.....	25
5.4 Kultur von Adipozyten und Stimulationsexperimente.....	26
5.5 RNA-Isolierung.....	27
5.6 DNase Behandlung der RNA.....	29
5.7 Analytische RNA-Gelelektrophorese.....	30
5.8 Reverse Transkription.....	30

5.9	Qualitative RT-PCR.....	31
5.10	Gelelektrophorese der PCR-Produkte.....	32
5.11	Sequenzierung der DNA.....	33
5.12	Quantitative RT-PCR (TaqMan).....	34
5.13	Präparation von Plasmid-DNA.....	37
5.14	Denaturierende RNA-Gelelektrophorese.....	39
5.15	Northern Blot.....	40
5.16	Herstellung radioaktiv markierter Sonden.....	41
5.17	Hybridisierung.....	41
5.18	Waschen der Membran und Exposition.....	42
5.19	Proteinisolierung.....	43
5.20	Proteinkonzentrierung.....	43
5.21	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	44
5.22	Western Blot Analyse.....	44
5.23	Proteinfärbungen.....	46
5.24	Immunhistochemie.....	46

6. Ergebnisse

6.1	PCR für das α -Defensin 1.....	48
6.2	Quantitative RT-PCR für das α -Defensin 1.....	52
6.3	Western Blot für das α -Defensin 1.....	53
6.4	Immunhistochemie für das α -Defensin 1.....	57
6.5	RT-PCR für das α -Defensin 5.....	58
6.6	Northern-Blot für das α -Defensin 5.....	62
6.7	Western Blot für das α -Defensin 5.....	63
6.8	Immunhistochemie für das α -Defensin 5.....	64

7. Diskussion

7.1	Neueste Erkenntnisse über die Rolle des Fettgewebes in der angeborenen Immunabwehr des Menschen.....	65
7.2	Humane peritoneale Adipozyten synthetisieren antimikrobiell wirksame Peptide (α -Defensine).....	65

7.3 Mögliche Implikationen des Vorhandenseins von Defensinen im Omentum majus...	69
7.4 Ausblick: Die Rolle von antimikrobiellen Peptiden im Zeitalter der Antibiotika-Resistenzen, Verwendung als Pharmaka.....	70
8. Zusammenfassung.....	72
9. Literaturverzeichnis.....	73
10. Lebenslauf.....	93

1. Antimikrobielle Peptide

1.1 Allgemeines zu angeborenem Immunsystem und antimikrobiellen Peptiden

Organismen, die lediglich über ein „primitives“ Immunsystem verfügen, welches ohne B- und T-Zellen auskommt, sind in der Lage, ihren Körper wirkungsvoll gegen eindringende Mikroorganismen zu schützen [Charlet et al, 1996]. Dieses Abwehrsystem, das sogenannte angeborene Immunsystem, ist eine erste Barriere gegen Pathogene. Es ist auch beim Menschen vorhanden und hat neben seiner ursprünglichen direkten Abwehrfunktion auch die Aufgabe, das adaptive Immunsystem zu regulieren. Somit steht es räumlich und zeitlich vor dem adaptiven Immunsystem [Fearon et al, 1996; Matzinger et al, 1998; Medzhitov et al, 1997 (Cell)]. Das Innate Immune System leistet also folgende Aktivitäten: 1. Erkennung von Mikroorganismen als fremd, 2. initiale Bekämpfung und Eliminierung des Pathogens und 3. Aktivierung des adaptiven Immunsystems.

Bestandteile des angeborenen Immunsystems sind die sogenannten antimikrobiellen Peptide. Als antimikrobielle Peptide werden Peptidmoleküle bezeichnet, die antimikrobielle Aktivität besitzen, weniger als 100 Aminosäuren lang und von individuellen Genen kodiert sind. Antimikrobielle Peptide sind natürlich vorkommende Antibiotika. Solche Peptide mit antimikrobieller Funktion wurden in allen Lebensformen, vom Bakterium bis hin zum Menschen, gefunden und stellen so wohl einen der konserviertesten Mechanismen der Evolution dar, den eigenen Organismus gegen aggressive Eindringlinge zu schützen [Ganz et al, 1995 (Pharm. Ther.); Ganz et al, 1997; Lehrer et al, 1999]. Mittlerweile wurden weit mehr als 100 unterschiedliche Moleküle beschrieben. Antimikrobielle Peptide von Vertebraten sind in Abwehrzellen, wie Makrophagen oder Granulozyten, in Blutplättchen und insbesondere Epithelzellen exprimiert. Ihr antimikrobielles Spektrum ist weit und umfasst gramnegative und -positive Bakterien, Pilze und lipidumhüllte Viren.

Das Innate Immune System bei Drosophila und bei Säugern (Maus, Mensch) besitzt homologe Rezeptoren, die Toll bzw. Toll Like Receptor (TLR) genannt wurden [Lemaitre et al, 1996; Medzhitov et al, 1997 (Nature); Yang et al, 1998]. Diese Rezeptoren interagieren mit konservierten Molekülstrukturen auf der Oberfläche von Mikroorganismen, den sog. Pathogen Associated Molecular Pattern (PAMP). Bei Insekten wird nach Aktivierung der Toll-Rezeptoren über eine intrazelluläre Signalkaskade die Expression antimikrobieller Peptide mit direkter antimikrobieller Funktion hochreguliert. Bei Säugern trat im Laufe der Evolution die wichtige Funktion hinzu, auch Zellen des adaptiven Immunsystems zu

stimulieren. Antimikrobielle Peptide dienen damit als Verbindungsglieder zwischen angeborenem und adaptiven Immunsystem.

1.2 Gruppen antimikrobieller Peptide

Peptidantibiotika sind Bestandteil des Abwehrsystems von Tieren und Pflanzen [Boman et al, 1991; Zasloff et al, 1991]. Eine Einteilung kann verschiedenen Prinzipien folgen. Es können Gruppen antimikrobieller Peptide nach Merkmalen der Sekundärstruktur des Moleküls gebildet werden. So gehören die Magainine des Frosches oder die Kathelicide LL-37/hCAP-18 der Säuger zu den linearen, α -helikalen Peptiden ohne Cysteine. Peptide mit Cysteinen und Disulfidbindungen sind das Katheliceidin Protegrin des Schweines und die α - und β -Defensine der Säuger. Zu den Peptiden mit ungewöhnlich hohem Anteil von ein oder zwei spezifischen Aminosäuren gehören das PR-39 des Schweines und das Indolicidin des Rindes. Eine andere Gliederung teilt die Substanzen aufgrund konservierter Sequenzabschnitte in Familien ein. Mitglieder einer Familie zeichnen sich so durch übereinstimmende Strukturcharakteristika aus (Homologie der Nukleotid- oder Aminosäuresequenz), zum Beispiel die konservierten Cysteine der Defensine (Abbildung 1). Das gemeinsame Strukturmerkmal der Kathelicide ist ein hoch konservierter Proanteil des Peptids. So unterscheiden sich Kathelicide in der Länge des aktiven C-terminalen Peptids stark.

1.3 Familien antimikrobieller Peptide des Menschen

Beim Menschen kommen Peptide der Defensin-, Katheliceidin- und Histatinfamilie vor.

1.3.1 Defensine

Defensine sind antimikrobielle Peptide, die drei intramolekulare Disulfidbrücken besitzen und hauptsächlich β -Faltblattstruktur aufweisen. α - und β -Defensine sind zwei Untergruppen, die sich unter anderem in der Ausbildung der Disulfidbrücken unterscheiden (Abbildung 1) [Ganz et al, 1995 (Pharm. Ther.)]. Derzeit sind beim Menschen sechs α -Defensine und sechs

β -Defensine bekannt, deren Gene auf Chromosom 8 gruppiert liegen. Defensine sind zwei Eigenschaften gemeinsam: Zum einen besitzen sie wegen des Vorkommens kationischer Aminosäuren (Arginin und Lysin) bei neutralem pH eine positive Nettoladung, zum anderen weist ihre dreidimensionale Struktur eine hydrophobe und eine hydrophile Seite auf [Hancock, 1997]. Diese Struktureigenschaften sind für den Wirkungsmechanismus wichtig. Abgesehen von diesen Übereinstimmungen variieren Defensine in Länge, Aminosäuresequenz und Sekundärstruktur.

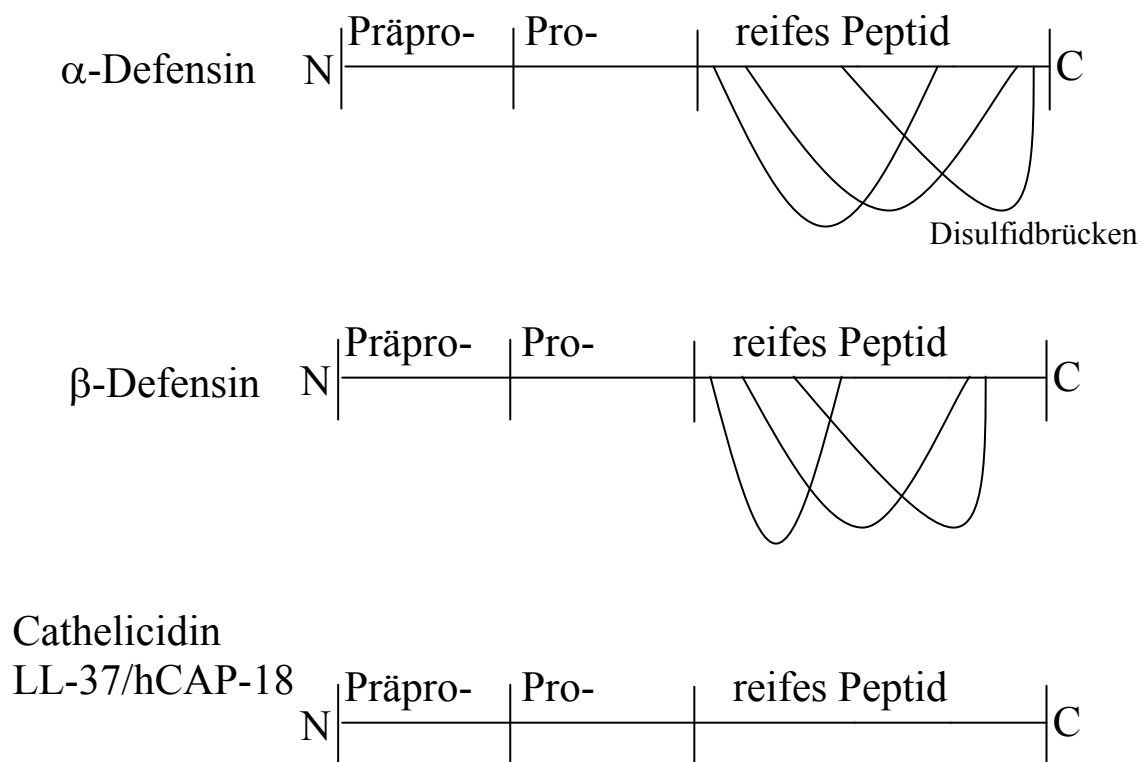


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Struktur antimikrobieller Substanzen. Nach Abspaltung der Vorläuferanteile hat das reife Peptid antimikrobielle Funktion. α - und β -Defensine zeichnen sich durch das Vorhandensein von drei intramolekularen Disulfidbrücken aus, wobei die Lage der Cysteine und deren Verknüpfung unterschiedlich ist. Das Charakteristikum der Kathelicidine ist eine hoch konservierte Proregion, die Cathelin genannt wird. Das C-terminal gelegene reife Peptid ist dagegen sehr individuell. (modifiziert aus: Bals R, Griesse M. Kleinmolekulare antimikrobielle Substanzen der Atemwegsflüssigkeit. In: Reinhardt D, Goetz M, Kraemer R, et al. Hrsg. Mukoviszidose. Heidelberg: Springer).

1.3.1.1 α -Defensine

α -Defensine sind zwischen 29 und 35 Aminosäuren lang und weisen eine β -Faltblattstruktur auf. α -Defensine des Menschen, Human Neutrophil Peptides 1–4 (HNP 1–4) finden sich vor allem in den primären (azurophilen) Granula neutrophiler Granulozyten, welche dafür bestimmt sind mit phagozytischen Vakuolen zu fusionieren [42]. Sie machen den Hauptteil des Granulainhalts aus (bis zu 18% der gesamten Proteinmasse eines Neutrophilen) und stellen einen wichtigen nicht oxidativen Mechanismus zur Abtötung von Mikroorganismen dar [Lehrer et al, 1991 (Cell)]. Humanes Defensin 5 und 6 (HD-5, HD-6) sind in Paneth-Zellen des Dünndarms und zum Teil auch im Urogenitaltrakt exprimiert [Bevins et al, 1996], werden jedoch auch in den Atemwegen gefunden. Neben der antimikrobiellen Aktivität all dieser Substanzen wurden auch Funktionen als Entzündungsmediatoren [Hiemstra et al, 1998] und Ionenkanäle [Lencer et al, 1997; Maget-Dana et al, 1997] beschrieben.

1.3.1.2 β -Defensine

β -Defensine sind zwischen 36 und 42 Aminosäuren lang und werden insbesondere an epithelialen Oberflächen produziert [Zhao et al, 1996]. Die β -Defensine werden auf Körperoberflächen gebildet, so beispielsweise auf der Haut [Harder et al, 1997], im Urogenital- [Valore et al, 1998; King et al, 2003; Yamaguchi et al, 2002], Gastrointestinal- und Respirationstrakt [McGray et al, 1997; Hiratsuka et al, 1998], aber auch in nicht-epithelialen Geweben wie Herz- und Skelettmuskel und in Leukozyten [zitiert nach: Schneider et al, 2005]. HBD-1 wird konstitutiv exprimiert, die Transkription und Sekretion von HBD-2 dagegen wird durch inflammatorische Mediatoren stimuliert [Bals et al, 1998 (J Clin Invest); Singh et al, 1998].

1.3.2 Kathelicidine LL-37/hCAP-18

Der einzige Vertreter dieser Familie beim Menschen wurde LL-37 (nach den beiden N-terminalen Aminosäuren des aktiven Peptids) oder hCAP-18 (Human Cationic Antimicrobial Peptide) genannt [Gudmundson et al, 1996; Larrick et al, 1995]. Initial wurde LL-37/hCAP-18 in sekundären Granula von neutrophilen Granulozyten beschrieben, später wurde das Peptid auch auf der Haut gefunden [Frohm et al, 1997]. In den Atemwegen wird LL-

37/hCAP-18 in den gleichen Zelltypen produziert, in denen auch β -Defensine und andere Abwehrsubstanzen gebildet werden [Bals et al, 1998 (Proc Natl Acad Sci)]. Nach intrazellulärer Speicherung werden Cathelicidine bei der Sekretion durch Endoproteolyse aktiviert. Die Überexpression von LL-37 mittels Gentransfermethoden resultierte in einer Steigerung der lokalen Infektabwehr in Tiermodellen von zystischer Fibrose, Lungenentzündung oder septischem Schock [Bals et al, 1999 (Infect Immun); Bals et al, 1998 (J Clin Invest)].

1.4 Verwendung von antimikrobiellen Peptiden als Pharmaka: klinische Studien

Mit dem Ziel, antimikrobielle Peptide oder deren Derivate als Therapeutika zu entwickeln, wurden mehrere Studien zur In-vivo-Toxizität und -Wirksamkeit antimikrobieller Peptide als Tierexperimente oder als Phase-I- bis -III-Humanstudien durchgeführt. Dabei wurden meist synthetische Substanzen verwendet. Eine Vielzahl von Tierstudien belegt, dass antimikrobielle Peptide auch in vivo gegen Infektionen wirksam sind, wie gegen peritoneale Infektionen der Maus mit *Pseudomonas aeruginosa* und im Stadium einer Sepsis [Gough et al, 1996]. Neben der antimikrobiellen Wirksamkeit besitzen einige antimikrobielle Peptide die Eigenschaft, bakterielles Endotoxin (LPS) zu binden und zu inaktivieren. Die Gabe des Cathelicidins LL-37 führte zu einer protektiven Wirkung gegen die letalen Folgen einer LPS-Applikation [Hirata et al, 1995]. Auch die endogene Überproduktion dieses Peptids schützt in einem murinen Modell gegen Lungeninfektion und Sepsis [Bals et al, 1999 (Infect Immun)]. Auch konnte in einem Tiermodell der zystischen Fibrose der Abwehrdefekt der Atemwegszellen durch Überexpression von LL-37 korrigiert werden [Bals et al, 1998 (J Clin Invest)].

2. Defensine

2.1 Defensinsynthese

Die Gene, welche für Defensine kodieren, weisen Intron-Exon-Struktur auf [Ganz et al, 1994 (Curr Opin Immunol)]. Sie sind alle auf dem kurzen Arm des Chromosoms 8 lokalisiert und sind in Clustern angeordnet.

α -Defensine werden im allgemeinen als Pre-pro-peptidsequenzen kodiert, bestehend aus einem „Precursor“-Molekül mit 90-100 Aminosäuren und einer Amino (N)-terminalen Sequenz (~ 19 Aminosäuren), einem anionischen Segment (~ 45 Aminosäuren) und einem Carboxy-terminalen reifen kationischen Defensin (~30 Aminosäuren) [Daher et al, 1998 (Proc Natl Acad Sci); Valore et al, 1992]. Das primäre Translationsprodukt ist ein Prä-pro-peptid (Abbildung 2), dessen N-terminales Zielpeptid beim Eintritt in das endoplasmatische Retikulum abgespalten wird. Der Pro-peptidanteil, welcher oft negativ geladen ist [Michaelson et al, 1992], hat möglicherweise die Funktion, die Aktivität des eigentlichen Peptids durch ladungsabhängige Interaktionen zu inhibieren [Valore et al, 1996; Liu et al, 1995].

Neutrophile α -Defensine werden in den neutrophilen Vorläuferzellen des Knochenmarks (Promyelozyten) synthetisiert [Yount et al, 1995; Arnljots et al, 1998; Cowland et al, 1999]. Reife Neutrophilen, welche im Blut zirkulieren oder in entzündeten Geweben gefunden werden, enthalten zwar große Mengen an α -Defensin, synthetisieren diese jedoch nicht (und auch die entsprechende mRNAs nicht). Lediglich kleine Mengen von partiell prozessierten intermediären Peptiden sind in reifen Neutrophilen detektabel. [Harwig et al, 1992]. Die für die Prozessierung der α -Defensine verantwortlichen Enzyme sind noch nicht identifiziert worden.

Speziell für die Prozessierung der Defensine in den Paneth'schen Zellen der Maus (Kryptidine), ist die Metalloproteinase Matrilysin (MMP7) erforderlich. Mäuse, die homozygot-rezessiv für das Matrilysin-Gen sind, können intestinale Prodefensine nicht zu Defensinen aktivieren und sind empfänglicher für Infektionen mit *Salmonella typhimurium* [Wilson et al, 1999]. Die Schlüsselenzyme beim Menschen, die für die Prozessierung des intestinalen Prodefensins HD5 verantwortlich sind, sind alle 3 Formen des Trypsins, die von den gleichen Paneth'schen Zellen synthetisiert werden, die auch das HD5 synthetisieren, speichern und sezernieren. Im Gegensatz zum α -Defensin 5 der Maus, dessen Aktivierung durch die Metalloproteinase Matrilysin extrazellulär geschieht [Wilson et al, 1999], werden Defensine in humanen Paneth'schen Zellen als Vorläufermoleküle gespeichert, welche erst nach deren Freisetzung aus den Granula modifiziert werden [Ghosh et al, 2002]. Dies wird durch das Vorhandensein des Trypsin-Inhibitors α 1-Antitrypsin unterstützt.

Die Struktur von β -Defensin Vorstufen ist einfacher, bestehend aus einer Signalsequenz, ein kleines (oder fehlendes) Pro-Segment und das reife Peptid am C-Terminus. Das Fehlen eines

anionischen Prosegments in β -Defensin Vorstufen im Gegensatz zu dem relativ großen anionischen Prosegment in α -Defensin Vorläufern, ist ein Unterschied, der bis jetzt nicht ausreichend erklärt wurde.

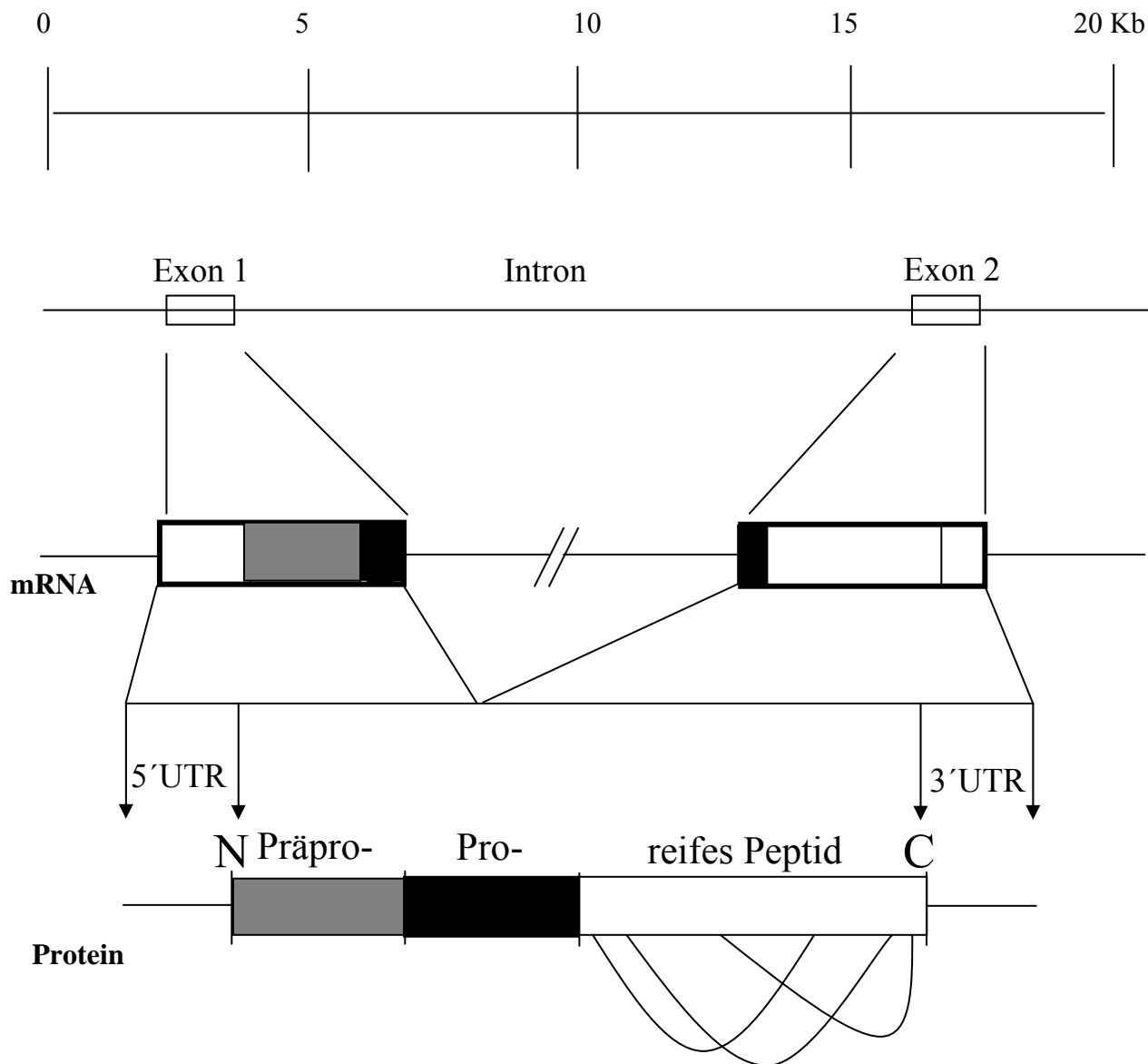


Abbildung 2. Darstellung der genomischen Struktur eines antimikrobiellen Peptids zusammen mit dem Aufbau der mRNA und des Peptids am Beispiel eines β -Defensins. Das Gen besteht aus Exons, die von Introns unterbrochen werden. Nach Synthese der mRNA (UTR = untranslated region, nicht translatierter Bereich) wird ein Präpropeptid gebildet, wobei für das obige Beispiel das erste Exon des Gens für das Prä- und einen Teil des Propeptids kodiert und das zweite Exon für das restliche Peptidmolekül.

2.2 Regulation der Defensinsynthese und –freisetzung

Humane neutrophile Defensine werden konstitutiv in Promyelozyten und frühen Myelozyten, den Differenzierungsvorstufen der Neutrophilen, im Knochenmark synthetisiert [Cowland et al, 1999]. Nach deren Reifung im Knochenmark und nachdem sie ihr Arsenal an Granula gebildet haben, hören Granulozyten mit der Synthese weiterer Granula auf, werden ins Blut freigesetzt und wandern in das Gewebe ein. Während der Phagozytose von Pathogenen, fusionieren defensin-reiche primäre Granula mit phagozytischen Vakuolen in denen sie hohe Defensinkonzentrationen generieren [Joiner et al, 1989].

Die Synthese von Defensinen in den Paneth'schen Zellen des Duodenums ist möglicherweise ebenso konstitutiv. Ihre Freisetzung ins Lumen der intestinalen Krypten erfolgt nach Exposition zu Bakterien oder als Antwort auf cholinerge Stimuli [Ayabe et al, 2000]. Die spezifischen Rezeptoren und Transduktionswege, welche die Defensinfreisetzung aus Paneth'schen Zellen regulieren sind bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht identifiziert worden.

HBD1, welches vor allem im Urogenitaltrakt, aber auch in der Haut und anderen Epithelien, exprimiert wird, scheint ebenfalls konstitutiv synthetisiert zu sein. Die HBD2 Synthese in der Haut wird durch Bakterien induziert, über einen Pathomechanismus, dem die intermediäre Interleukin-1 (IL-1) Synthese [Liu et al, 2003] aus dendritischen Zellen oder Makrophagen vorausgeht. [Tsutsumi-Ishii et al, 2003]. Die Induktion von HBD2 mRNA durch IL-1 ist abhängig von der Interaktion des spezifischen nukleären Faktor κ B (NF- κ B) (-205 bis -186) mit dem p65-p50 NF- κ B Heterodimer. Isomoto et al fanden erhöhte HBD2 Konzentrationen im Magensaft von Personen mit einer *Helicobacter pylori* Gastritis im Vergleich zu Gesunden, jedoch keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen in den Konzentrationen des HBD1 [Isomoto et al, 2005]. HBD3 [Sorensen et al, 2003] und HBD4 [Garcia et al. 2001] werden durch NF- κ B unabhängige Mechanismen reguliert, welche noch charakterisiert werden müssen.

2.3 Wirkungsmechanismus

Die Permeabilisation von Zielmembranen ist der entscheidende Schritt in der defensin-medierten antimikrobiellen Aktivität und Zytotoxizität.

Defensine sind bei physiologischem pH positiv geladen. Dadurch kommt es zu Interaktionen mit negativen Ladungen auf der Oberfläche von Mikroorganismen, insbesondere mit Lipopolysacchariden (Abbildung 3). Diese ladungsabhängigen Interaktionen verleihen Defensinen eine relative Spezifität gegenüber Zellmembranen von Bakterien, da diese im Allgemeinen mehr negative Ladungen aufweisen [Fujii et al, 1993] als eukaryontische Zellen. Nach der ladungsabhängigen Interaktion mit negativ geladenen Oberflächenmolekülen der Zielzelle kommt es zu Wechselwirkungen mit der Membran [Hristova et al, 1997; Lohner et al, 1997]. Durch ihren amphipathischen Charakter lagern sich Defensine in die Membran ein (Abbildung 3). Die Ausbildung von Kanälen durch die zytoplasmatische Membran mit Zusammenbruch des Membranpotentials führt schließlich zum Untergang der betroffenen Zelle.

In Experimenten mit künstlichen Membranen bestehend aus Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylcholin und Phosphatidylserin im Verhältnis 2:2:1 hat sich gezeigt, dass die Defensine NP1 (Kaninchen) und HNPI (Mensch) Kanäle formten, wenn ein negatives Potential an der Membranseite gegenüber der defensin-haltigen Lösung angelegt wurde [Kagan et al, 1990]. Dieser Effekt blieb aus wenn kein transmembranäres Potential extern angelegt wurde [Fujii et al, 1993]. Bakterielle Modelle (*Escherichia coli* ML-35) [Lehrer et al, 1989] und die Säugetier-Zelllinie K562 [Lichtenstein et al, 1991], wurden nach der Behandlung mit Defensinen permeabel für kleine Moleküle wie chromogene Enzymsubstrate. Der beobachtete Austritt von Färbemarkern implizierte, dass Kanäle (ionen- oder wasserpermeable Strukturen in der Membran) gebildet werden. Unter Verwendung von Markern unterschiedlicher Größen wurde die Porengröße auf 25 Angström eingeschätzt und ein Model einer solchen Pore in Form eines Hexamers bestehend aus 3 Dimeren postuliert.

Für manche Defensine erfolgte der Austritt von Markern aus Vesikeln in einem „Alles-oder-Nichts“-Mechanismus [Wimley et al, 1994], darauf hinweisend, dass die gebildeten Poren stabil waren. Trotzdem ist die stabile Porenbildung nicht die einzige Möglichkeit der Interaktion zwischen Defensinen und Membranen. Die noch kationischeren Kaninchendefensine bilden Poren, die zu einem partiellen Austritt von Markern führen, was auf Instabilität hindeutet. Es ist möglich, dass sich die hoch-kationischen Defensinmoleküle des Kaninchens gegenseitig abstoßen, so dass die Poren destabilisiert werden.

Eine einheitliche Hypothese über den Effekt der Membranpermeabilisation wird dadurch kompliziert, dass es zwischen den Defensinen Unterschiede bezüglich Netto-Ladung,

Aminosäuresequenz und quartäre Struktur (Monomere versus Dimere) gibt. Es ist denkbar, dass sich diese Unterschiede in der Evolution so heraus kristallisiert haben, damit die Defensine differenziert mit Bakterien interagieren. Eine weitere Komplexizität entsteht aus der Tatsache, dass die flexiblen basischen Seitenketten der Aminosäuren verschiedenartige Interaktionen mit den Phospholipidgruppen oder Wasser eingehen können. Die Interaktionen von Defensinen mit der Zellmembran wurden zwar in verschiedenen Modellen beschrieben [Wimley et al, 1994], aber es gibt nur rudimentäre experimentelle Daten bezüglich der Struktur der Defensinkomplexe in der Membran.

In anderen Experimenten wurden große Vesikel bestehend aus dem negativ geladenen Phospholipid Palmitoylphosphatidylglycerol durch das humane Defensin HNP2 permeabilisiert, wobei die Zugabe von neutralen Phospholipiden zum Lipidgemisch sowohl das Binden der Defensine als auch die Permeabilisierung der Membran inhibierte [Wimley et al, 1994]. Unter diesen Bedingungen blieb das Absterben der Bakterien aus, eine Tatsache, die die Bedeutung der Permeabilisierung für die bakterizide Wirkung der Defensine demonstriert. Andererseits konnten permeabilisierte K569 Zellen innerhalb einer Stunde „gerettet“ werden, indem man das Defensin entfernte. Dies könnte auf zusätzlich intrazellulär ablaufenden Mechanismen (Interaktionen mit periplasmatischen und zytoplasmatischen Makromolekülen), die zum Zelltod beitragen, hindeuten [Lichtenstein et al, 1991].

Weiterhin sind noch andere Wirkungsmechanismen von Defensinen beschrieben worden, die zum Teil spezifische Interaktionen mit Rezeptormolekülen oder Interaktionen mit intrazellulären Molekülen beinhalten. Manche Defensine binden an Membranglykoproteine [Wang et al, 2003] und entfalten eventuell dadurch ihre Aktivität. Hierzu zählt z.B. das Cathelicidin PR-39, ein antimikrobielles Peptid, das aus dem Darm und neutrophilen Granulozyten des Schweins isoliert wurde [Agerbeth et al, 1991; Shi et al, 1994]. Die antibakterielle Funktion beruht nicht auf der Ausbildung von Membranporen, sondern auf der Bindung an intrazelluläre Rezeptoren. Dieses Peptid spielt eine Rolle bei der Wundheilung [Gallo et al, 1994], bei der Attraktion von Neutrophilen [Huang et al, 1997], sowie bei der Angiogenese [Li et al, 1999].

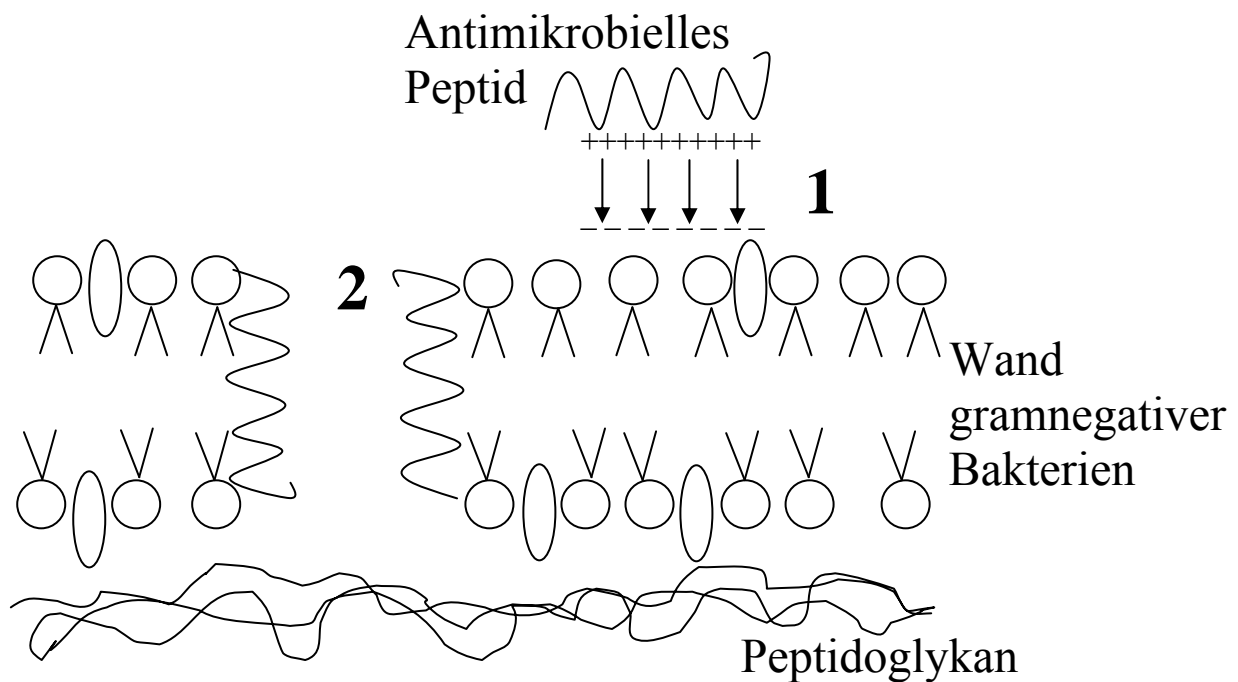


Abbildung 3. Wirkungsweise kationischer antimikrobieller Peptide. Zwischen dem positiv geladenen Peptid und der negativ geladenen Oberfläche von Mikroorganismen (Lipopolysaccharide) kommt es zu Wechselwirkungen (1). In ausreichender Konzentration vorhanden, bilden die Peptide aufgrund ihrer amphipathischen Eigenschaften Poren in den Biomembranen (2), wobei die hydrophobe Seite der Peptidmoleküle nach außen hin zu den Membranlipiden gerichtet sind und die hydrophilen Seiten die Poreninnenwand bilden. Die Ausbildung dieser Poren führt schließlich in kurzer Zeit (Minuten) zur Abtötung des Pathogens.

Bezüglich der Struktur der Defensinkomplexe in der Membran gibt es nur rudimentäre experimentelle Daten.

Es gibt Beweise dafür, dass Defensine –nach Penetration der Zellwand- auch mit periplasmatischen und zytoplasmatischen Makromolekülen interagieren können. Diese Interaktionen könnten ebenso zum letalen Effekt von Defensinen auf Mikroorganismen beitragen.

2.4 Weitere Aktivitäten der Defensine

Verschiedenen Defensinen wird eine chemotaktische Aktivität auf Monozyten, T-Zellen und dendritischen Zellen zugeschrieben [Territo et al, 1989; Chertov et al, 1996; Yang et al, 1999;

Yang et al, 2000]. Im Falle von HBD1 und HBD2, könnte die Rekrutierung von Gedächtnis T-Zellen und unreifen dendritischen Zellen auf die Bindung dieser Defensine an den Chemokin-Rezeptor CCR6 zurückgeführt werden [Yang et al, 1999]. Die physiologische Bedeutung dieser Interaktion ist noch nicht eindeutig geklärt. Es ist trotzdem denkbar, dass HBD2, vor allem z.B. in hohen Konzentrationen bei einer Dermatitis, mit dem natürlich vorkommenden CC Chemokinligand 20 (CCL20) kompetitiert. Eine strukturelle Analyse der Rezeptorbindungsregion des CCL20 zeigte signifikante Ähnlichkeiten zum HBD2. Humane neutrophile Defensine HNP1-3 wirken chemotaktisch auf Monozyten [Territo et al, 1989], naive T-Zellen und unreife dendritische Zellen [Yang et al, 2000], wobei noch kein spezifischer Rezeptor identifiziert wurde.

Manche Defensine bekannt als Kortikostatine [Zhu et al, 1987; Zhu et al, 1989; Solomon et al, 1991] antagonisieren die Wirkung des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) indem sie an den ACTH-Rezeptor binden [Tominaga et al, 1990] ohne diesen zu aktivieren. Die physiologische Rolle dieser in vitro Interaktion ist noch nicht geklärt.

Das murine β -Defensin 2 wirkt als ein Peptidadjuvant wenn es an ein nicht-immunogenes Tumorantigen gekoppelt wird [Biragyn et al, 2002]. Diese immunstimulatorische Aktivität scheint über den Toll-like Rezeptor 4 (TLR 4) und die Ausreifung von dendritischen Zellen zu geschehen. Eine weitere beschriebene Aktivität mancher Defensine in bereits nanomolaren Konzentrationen ist ihre Fähigkeit nifedipin-sensitive Kalzium-Kanäle in Säugetierzellen zu aktivieren [MacLeod et al, 1991; Bateman et al, 1996]. Die strukturelle Basis dieses Effektes ist nicht bekannt. Bestimmte Defensine der Paneth'schen Zellen der Maus aktivieren die Chloridsekretion, möglicherweise durch Formung von Kanälen in der apikalen Membran epithelialer Zellen [Lencer et al, 1997; Merlin et al, 2001].

2.5 Defensinwirksamkeit

In-vitro-Versuche, bei denen gereinigte Defensine verwendet wurden zeigten eine antimikrobielle Aktivität dieser Substanzen gegenüber nicht nur grampositiven und -negativen Bakterien, sondern auch gegenüber Pilzen und umhüllten Viren [Lehrer et al, 1985; Daher et al, 1986; Hancock et al, 1997].

Die antimikrobielle Aktivität von Defensinen zeigt sich besonders unter den Bedingungen geringer Ionenstärke [Selsted et al, 1984; Selsted et al, 1985; Lehrer et al, 1988 (J Clin

Invest)) und niedrigen Konzentrationen an divalenten Kationen, Plasmaproteinen oder anderen interferierenden Substanzen. Unter diesen optimalen Bedingungen wird eine antimikrobielle Aktivität schon bei Konzentrationen von 1-10µg/ml beobachtet. Ein Anstieg von Salzkonzentration und Plasmaproteinen inhibiert kompetitiv die antimikrobielle Aktivität von Defensinen. Das Verschwinden der Aktivität von Defensinen bei hohen Salzkonzentrationen ist ein weiterer Tatbestand, der die Bedeutung von elektrostatischen Kräften zwischen den anionischen Phospholipidgruppen und den kationischen Defensinen unterstützt. Manche Defensine wirken in höheren Konzentrationen zytotoxisch auf Säugetierzellen [Lichtenstein et al, 1986; Lichtenstein et al, 1988; Lichtenstein et al, 1991].

Obwohl ihre antimikrobielle Aktivität in vitro nicht so hoch ist wie die einiger konventioneller Antibiotika, liegen minimal inhibitorische Konzentrationen (MIC) gegen multiresistente Organismen mit 1 bis 8 µg/ml im Bereich potenter Antibiotika. Antimikrobielle Peptide töten Bakterien im Gegensatz zu konventionellen Antibiotika im Verlauf weniger Minuten, sie sind mikrobizid. Für einige Substanzen konnte ein Synergismus mit chemischen Antibiotika oder mit körpereigenen Abwehrsubstanzen, wie Lysozym oder Lactoferrin, nachgewiesen werden [Bals et al, 1998 (J Clin Invest); Bals et al, 1998 (Proc Natl Acad Sci)]. Neben der mikrobiziden Wirkung besitzen Peptidantibiotika eine Aktivität gegen Endotoxin [Bals et al, 1999 (Infect Immun); Hirata et al, 1995]. Es sind einige Mechanismen der Resistenzentwicklung gegenüber antimikrobiellen Peptiden beschrieben worden, im Allgemeinen besteht jedoch eine ausgesprochen geringe Tendenz zur Ausbildung von Resistenzen [Hancock et al, 1997]. Mechanismen zur Resistenzentwicklung umfassen Veränderungen von Effluxpumpensystemen [Shafer et al, 1998] oder die Modifikation von Oberflächenbestandteilen der äußeren Hülle von Mikroorganismen [Lysenko et al, 2000; Peschel et al, 1999].

Experimente mit Mäusen lieferten bedeutende Hinweise auf die protektive Rolle von Defensinen in den frühen Stadien der Entzündung. Dabei erwiesen sich Modelle mit transgenen Mäusen als sehr hilfreich, wie z.B. der Vergleich von Mäusen des Wildtyps mit Matrilysin-knockout-Mäusen, die nicht in der Lage sind, murine intestinale Defensine zu aktivieren.

Intestinale Segmente von Wild-Typ-Mäusen enthalten und sezernieren in vitro eine größere antimikrobielle Aktivität als Matrilysin-knockout-Mäuse [Ayabe et al, 2000]. Nach oraler Gabe von E. coli ist die Anzahl lebender Bakterien im proximalen Intestinum von Wildtyp-

and Matrilysin-knockout-Mäusen ähnlich, wobei die Wildtyp-Mäuse niedrigere Bakterienzahlen im mittleren und distalen Intestinaltrakt -den Orten mit der höchsten Dichte an Paneth'schen Zellen- zeigen. Außerdem kann bei den Mäusen des Wild-Typs die antimikrobielle Aktivität größtenteils durch defensin-spezifische Antikörper neutralisiert werden. Dies deutet darauf hin, dass Defensine für den größten Teil der Aktivität verantwortlich sind. Kürzlich wurde ein Modell beschrieben, bei dem transgene Mäuse das humane HD5 Defensin der Paneth'schen Zellen exprimieren [Salzman et al, 2003]. Das HD5 hat, verglichen mit den Defensinen der Paneth'schen Zellen der Maus, eine größere antibakterielle Potenz gegenüber dem Mauspathogen *S. typhimurium*. HD5-transgene Mäuse sind vollkommen geschützt vor *S. typhimurium*-Infektionen, auch bei Verabreichung oraler Dosen, welche für die Wild-Typ Mäuse letal waren. Ein Schutz vor Infektion war innerhalb von 6 Stunden zu beobachten, korrelierte mit geringeren Zahlen von *S. typhimurium* im intestinalen Lumen und verhinderte die Ausbreitung der Infektion auf andere Organe. Der Effekt des transgenen Defensins ist lokal, da die intraperitoneale Inokulation mit Überbrückung des Intestinums die gleiche Mortalität bei den transgenen und den Wild-Typ Mäusen verursachte. Die spezifisch im Intestinallumen ablaufenden Effekte des transgenen Defensins frühzeitig im Verlauf der Infektion, liefern den stärksten Beweis dafür, dass Defensine als lokal sezernierte Antibiotika wirksam sind. Leider fehlt es Mäusen an granulozytären Defensinen und die transgene Expression von humanen granulozytären Defensinen führt zu relativ geringen Konzentrationen an reifen Defensinen in Granulozyten (R. Linzmeier und T. G., unpublizierte Ergebnisse). Mäuse defizient an murinem β -Defensin 1 zeigen lediglich milde Defekte [Morrison et al, 2002; Moser et al, 2002] in der Wirtsabwehr des urogenitalen und respiratorischen Traktes, möglicherweise aufgrund der Redundanz unter den murinen Defensingenen.

Sun et al. haben postuliert, dass die humanen β -Defensine, insbesondere HBD1 und HBD2, die in hohem Maß vom Epithel der Mundschleimhaut exprimiert werden, eine HIV-Infizierung in einer dosisabhängigen Weise und in Konzentrationen wie man diese Defensine in der Mundhöhle vorfindet, verhindern können. Dies könnte mit ein Grund des relativ geringeren Risikos der Ansteckung mit HIV auf oralem Wege sein [Sun et al, 2005]. Die Übersichtsarbeit von Papo et al liefert gesammelte vielversprechende Ergebnisse bezüglich einer antikanzerogenen Wirksamkeit von antimikrobiellen Peptiden, wobei die genauen molekularen Mechanismen noch unklar sind [Papo et al, 2005]. Aufgrund der Tatsache, dass Defensine in entzündeten Geweben in hoher Konzentration vorhanden sind und dass Zellen auf den Einfluss von Defensinen hin proinflammatorische Signale generieren, [Van Wetering

et al, 1997] könnten Defensine zur Gewebeläsion beitragen, vor allem in der Lunge [Zhang et al, 2001]. Im Verlauf der Akkumulation von Neutrophilen bei Atemwegsentzündungen kommt es in den Atemwegen zu hohen Konzentrationen an α -Defensinen, die zytotoxische Effekte zur Folge haben können [Hiemstra et al, 1998; Soong et al, 1997].

2.6 Beziehung zur Pathogenese von Erkrankungen

Genauso wie eine Vielzahl von Indizien darauf hinweist, dass antimikrobielle Peptide für die Abwehr des menschlichen Organismus eine wichtige Rolle spielen, so existieren auch Hypothesen über Beziehungen zwischen Ausfällen der Funktion antimikrobieller Peptide und das Auftreten von Krankheiten. Ein wichtiger Grund dafür ist, dass das Abwehrsystem des Menschen ein äußerst komplexes Gefüge zahlreicher Faktoren ist, deren isolierte Funktion nur schwer experimentell zu erfassen ist.

Eine mögliche Rolle der Defensine in der Pathogenese von Erkrankungen kann am Beispiel der zystischen Fibrose gezeigt werden. Die zystische Fibrose (ZF) ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, die durch eine Mutation im sogenannten „cystic fibrosis transmembrane regulator“- (CFTR-) Gen charakterisiert ist. Dieses Gen kodiert für einen defekten Chloridkanal, der in allen exokrinen Drüsen die Bildung zäher Schleimsekrete bewirkt. Die Hauptursache für Morbidität und Mortalität bei zystischer Fibrose ist die Ateminsuffizienz aufgrund einer progressiven Destruktion der Atemwege und Lungen durch rezurrenente Infektionen. Typischerweise werden die epithelialen Oberflächen in Nase, Sinus und unteren Atemwege schon im Kindesalter mit *S. aureus*, *Haemophilus influenza* und *Pseudomonas aeruginosa* kolonisiert. Smith et al. [Smith et al, 1996] haben vorgeschlagen, dass der Defekt der epithelialen Wirtsabwehr das Ergebnis der Inhibierung der Defensinaktivität aufgrund der abnormalen ionischen Zusammensetzung der Atemwegsflüssigkeit bei zystischer Fibrose ist.

Die dünne Flüssigkeitsschicht auf dem respiratorischen Epithel hat normalerweise eine niedrigere Salzkonzentration im Vergleich zum Blutplasma. Dies begünstigt die elektrostatischen Wechselwirkungen von Defensinen und anderen kationischen Peptiden mit den Zielzellen. Bei der zystischen Fibrose ist die Fähigkeit Natriumchlorid von der epithelialen Flüssigkeit zu absorbieren durch den Mangel an funktionierenden Chloridkanälen eingeschränkt. Folglich ist die Natriumkonzentration der respiratorischen Flüssigkeit erhöht und die Aktivität von Defensinen und anderen kationischen antimikrobiellen Peptiden erniedrigt („high salt“-Hypothese). Die Rolle der Defensine in der Pathogenese der zystischen

Fibrose bleibt jedoch spekulativ. Andere Hypothesen sind ebenso vorgeschlagen worden [Matsui et al, 1998; Wine et al, 1999; Verkman et al, 2003].

Weitere Beispiele sind angeborene Störungen in der Ausreifung von Granulozyten, die klinisch durch gehäufte bakterielle Infektionen charakterisiert sind [Ganz et al, 1988 (J Clin Invest)]. In weiteren Studien wurden Polymorphismen in HBD1 Genen mit erhöhter Anfälligkeit für chronisch-obstruktive Lungenerkrankungen [Matsushita et al, 2002] und mit hohen Inzidenzen von oraler Candidiasis bei Diabetikern [Jurevic et al, 2003] in Verbindung gebracht. Eine Störung der antimikrobiellen Abwehr durch die intestinalen Paneth'schen Zellen scheint ebenso ein kritischer Faktor in der Pathogenese des M. Crohn zu sein [Wehlkamp et al, 2005]. Einige Befunde weisen auf eine Rolle der Defensine in der Pathophysiologie der Hyperlipidämie und Atherosklerose hin. In den Experimenten von Higazi et al [Higazi et al, 1997] förderten Defensine sowohl die Bindung von Lipoprotein (a) an endothelialen Zellen und glatten Muskelzellen als auch dessen Internalisierung. Weiterhin wurde gezeigt, dass Defensine stabile Komplexe mit Lipoprotein (a) und LDL bilden, die in der Gefäßintima „gefangen“ bleiben und so zu einer Akkumulation von Lipiden im Extrazellularraum führen [Bdeir et al, 1999]. Der Effekt von Defensinen auf die Angiogenese und die Interferenz mit der Entwicklung funktioneller Vasa vasorum in der Gefäßwand (klinisch bedeutsam bei der Aortendissektion und der KHK) wurde von Chavakis et al. [Chavakis et al, 2004] beschrieben. Schliesslich besitzen Defensine antifibrinolytische Aktivität und könnten so eine Rolle in thrombotischen mikrovaskulären Okklusionen spielen [Higazi et al, 1996]. Die Signifikanz all dieser Ergebnisse in vivo bedarf weiterer Prüfungen.

3. Das Fettgewebe

Das Fettgewebe als Bindegewebsform besteht zu bis zwei Dritteln aus reifen Adipozyten, die durchsetzt sind von verschiedenen anderen Zelltypen, beispielsweise Präadipozyten in unterschiedlichen Differenzierungsphasen und Fibroblasten [Ailhaud et al, 1992]

In normalgewichtigen Menschen macht das Fettgewebe 8-20 kg aus [Jequier et al, 1999], wobei dieser Anteil durch das Nahrungsangebot reguliert wird, was die Hauptaufgabe dieses Organs impliziert: Das Fettgewebe speichert Energie in Form von Triacylglycerolen bei Kalorienüberfluss, bei Nahrungsmangel werden diese Brennstoffe als Fettsäuren freigesetzt.

Außerdem dient das Körperfett der Wärmeisolierung, polstert bestimmte Organe und federt mechanische Stoßwirkungen ab. Die Thermogenese ist eine Besonderheit des braunen

Fettgewebes, das sich aus plurivakuolären Fettzellen mit mehreren Fetttröpfchen und vielen Mitochondrien zusammensetzt, während die Adipozyten des weißen Fettgewebes als univakuolär zu charakterisieren sind [Jequier et al, 1999]. Die Expression des Protonenkanals Thermogenin (UCP 1) in Adipozyten des braunen Fettgewebes führt hier zur Entkopplung von Protonengradient und ATP-Synthese bei der oxidativen Phosphorylierung in der mitochondrialen Atmungskette, wobei die frei werdende Energie als Wärme abgeführt wird [Trayhurn et al, 1996].

Darüber hinaus ist in den letzten Jahren die Funktion des Fettgewebes als endokrines Organ, das eine Reihe von Hormonen und anderen Signalmolekülen synthetisiert und sezerniert, immer deutlicher geworden [Mohamed-Ali et al, 1998]. An dieser Stelle erwähnt seien die Produktion von Zytokinen (TNF α , IL-6) [Kern et al, 1995], ASP (acylation stimulating protein) [Maslowska et al, 1997], Angiotensin II [Schling et al, 1999], sowie die Sekretion des Proteohormons Leptin, das eine wichtige Rolle bei der Regulation des Körpergewichtes spielt [Friedman et al, 1998], und Resistin, welches als Bindeglied zwischen Adipositas und Diabetes diskutiert wird [Steppan et al, 2001].

Das Omentum majus insbesondere wurde als Ort von Antikörpersynthese dargestellt (Walker et al, 1961). Es wird in der Abdominalchirurgie empirisch dafür verwendet, um Anastomoseflächen „abzudichten“ und somit der Ausbreitung von Peritonitiden vorzubeugen (Allgöwer et al in „Chirurgische Gastroenterologie“, Springer Berlin-Heidelberg-New York 1981, S.: 1076-1078; Dziri et al, 1999).

4. Ziel der Studie:

Existiert in der menschlichen Bauchhöhle ein lokales antibakterielles System durch die ortsständige Synthese antibiotischer Peptide (Defensine)?

Obwohl die Körperoberflächen des Menschen einer mannigfaltigen Anzahl von Bakterien ausgesetzt sind, ist eine Infektion der Haut oder anderer Organe bei einer Verletzung nicht zwangsläufig der Fall. Im Gegenteil kommt es in der überwiegenden Anzahl der Fälle zu einer Heilung, ohne dass Zeichen einer Entzündung auftreten. So ist eine bakterielle Peritonitis auch bei der ambulanten Peritonealdialyse (CAPD), trotz permanenter Entzündungsstimuli aufgrund der Exposition mit der Spüllösung und dem Spülkatheter eine seltene Komplikation. Inwieweit Zellen, welche die Grenzflächen der Bauchhöhle bilden,

durch die Synthese von Peptiden mit antimikrobieller Aktivität (Defensinen) zur Infektabwehr beitragen, war Gegenstand dieser Studie. Ziel war der Nachweis der Synthese von Defensinen innerhalb der humanen Peritonealhöhle und die Identifikation des Defensin exprimierenden Zelltypes.

5. Material und Methoden

5.1 Material (Granulozyten, Duodenum, Adipozyten)

Aus dem Blut freiwilliger gesunder Personen wurden mit der weiter unter beschriebenen Methode nach Ficoll Granulozyten isoliert. Granulozyten dienten in unseren Experimenten als positive Kontrolle für das humane α -Defensin 1-4 (HNP 1-4), da sie dies in großen Mengen enthalten.

Während endoskopischer Untersuchungen mit Biopsieentnahme (Chirurgische Klinik München Innenstadt) wurden Duodenum-Proben gewonnen und uns zur Verfügung gestellt. Duodenum war die positive Kontrolle für das humane α -Defensin 5 (HNP 5).

Omentum-Gewebe für die Isolierung von Adipozyten wurde während einer Laparotomie oder bei einer offenen bauchchirurgischen Intervention entnommen.

Die Methodik der RNA- und Proteingewinnung wird in dieser Arbeit für die Adipozyten beschrieben. Entsprechend wurde für die Gewinnung von RNA und Protein aus Granulozyten und aus Duodenum vorgegangen.

5.2 Granulozytenisolierung (Methode nach Ficoll)

12 ml Histopaque 1119 (Sigma diagnostics) werden in ein 50ml Röhrchen gegeben und mit 12 ml Histopaque 1077 (Sigma diagnostics) überschichtet. Beide Histopaque-Lösungen werden dann vorsichtig mit 24 ml Heparin-Blut überschichtet. Die Lösung wird anschliessend bei 700 g für 30min ohne Bremse zentrifugiert. Im ersten Gradient nach Zentrifugation befinden sich dann die PBMCs, die abgenommen werden und im zweiten Gradienten die Granulozyten, die auch vorsichtig abgenommen, in ein Eppendorff-Gefäß übertragen und kurz herunterzentrifugiert werden. Beim Abnehmen der Granulozyten ist darauf zu achten, möglichst keine Erythrozyten mit aufzunehmen. Die Granulozyten werden dann 2 Mal mit PBS (Gibco) gewaschen und zwischen den Waschschritten jeweils 10 Minuten bei 200 g zentrifugiert.

5.3 Isolierung von Adipozyten aus dem Omentum

Da das Augenmerk unserer Untersuchungen auf die Adipozyten des Omentums gerichtet war, mussten diese isoliert und gereinigt werden. Deswegen wurde Omentum-Gewebe innerhalb kurzer Zeit aus dem OP in 0,9%-iger NaCl-Lösung bei Raumtemperatur -Adipozyten degradieren bei 4°C- und unter sterilen Bedingungen ins Labor gebracht. Im Folgenden wird die Methodik der Fettzellisolierung beschrieben. Die gesamte Prozedur findet unter der Zellhood unter sterilen Bedingungen statt [Rodbell, 1964, modifiziert]:

Erst wird das Gewebe grob von Bindegewebe und sichtbaren Blutgefäßen befreit und mit einem Skalpell zerkleinert, bevor es in die „Verdau“-Lösung überführt wird. Pro Gramm Gewebe wird 1 ml DMEM-Medium (Life Technologies) ohne FCS (Bio Whittaker) (z.B. 10 ml Lösung für 10g Gewebe) verwendet. Dafür wird pro ml Medium 1 mg Kollagenase (Kollagenase Typ 1, N° C1-22 von Biochrom) und 15 mg Rinderserumalbumin bei Raumtemperatur gelöst. Das Gewebe wird anschliessend für 30-60 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert und die Lösung intermittierend 1-2 mal vorsichtig manuell geschüttelt.

Es folgt die Filterung des verdauten Gewebes durch einen 250 µm Filter zur Entfernung der groben Stücke. Die gefilterte Lösung wird dann 15 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Auf diese Weise steigen die leichten -da lipidreichen- Adipozyten auf und es bildet sich eine bräunliche Phase, die Adipozyten enthält. Ist diese Phase hellgelb, dann sind die Adipozyten noch intakt, geben die Zellen hingegen ihr Fett ab, färbt sich die Phase gelb-bräunlich.

Die Adipozyten werden mit einer großlumigen Glaspipette abgenommen, mit dem doppelten Volumen an 0,9%iger NaCl-Lösung, die 4% BSA enthielt, vorsichtig versetzt und bei 400 g für 1 Min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wird noch weitere 3 Male wiederholt. Dabei werden alle anderen Zelltypen pelettiert, viele Adipozyten gehen durch den Zentrifugationsschritt andererseits zugrunde. Auf diese Art und Weise erhält man jedoch hochgereinigte Adipozyten [Rodbell, 1964].

Auf der Suche nach Defensin-synthetisierenden Zellen innerhalb der Peritonealhöhle und unter dem Verdacht des Adipozyten als Defensin-Produzenten wurde das Augenmerk auf die Fettzelle gerichtet.

Basierend auf der von Rodbell beschriebenen Methode der Adipozytenisolierung bzw. –purifizierung, wurden vom Omentum Adipozyten isoliert und in die weiteren Experimente eingesetzt, nämlich die RT-PCR, den Western Blot und die Immunhistochemie.

Isolierung von Adipozyten aus humanem Omentum (Separierung von Endothelzellen, Mastzellen, Makrophagen)

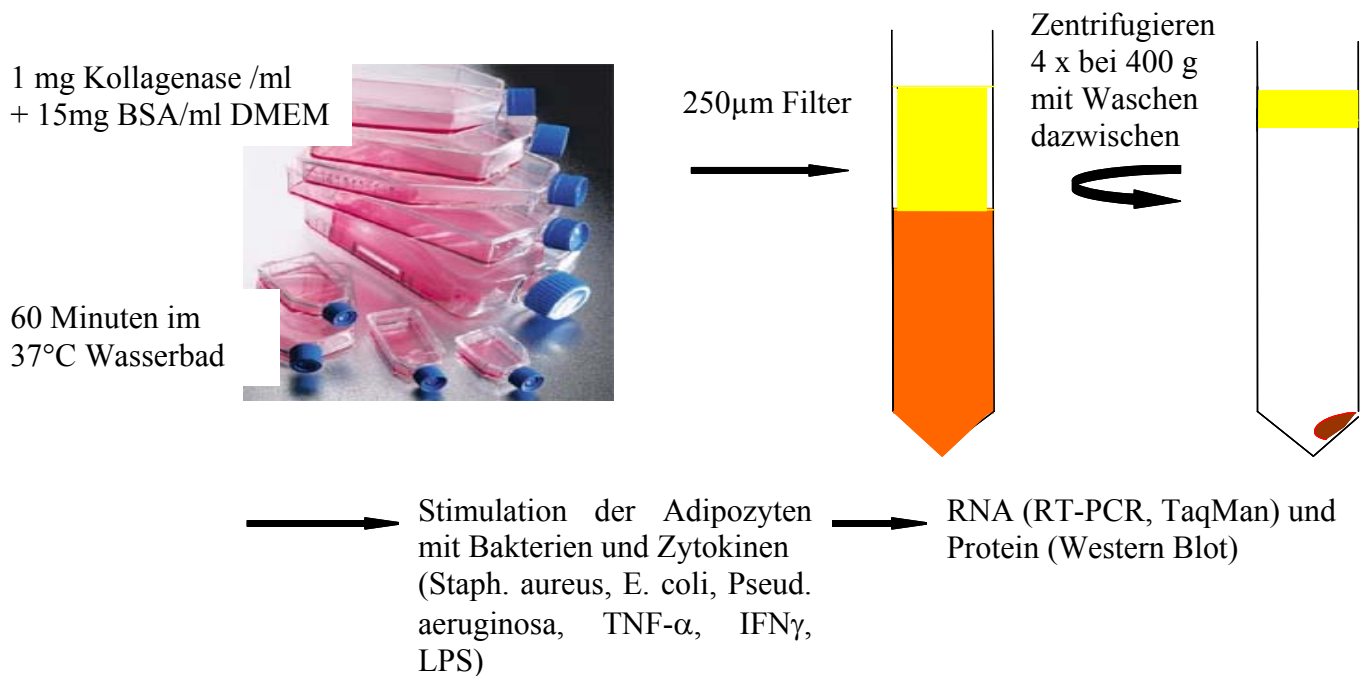


Abbildung 4: Isolierung von Adipozyten nach Rodbell (1964, modifiziert) und Schema der weiteren Verarbeitung in der vorliegenden Arbeit

5.4 Kultur von Adipozyten und Stimulationsexperimente

Die isolierten Adipozyten wurden in 6- oder 12-well Platten in DMEM Medium mit 10 % FCS (hitzeinaktiviert) ausgesät und entweder

- unstimuliert belassen, oder durch Zugabe ins Kulturmedium mit
 - TNF- α (20 ng/ml)
 - IFN- γ (40 ng/ml)
 - LPS (1 μ g/ml)
 - Bakterien (*Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, 2 *Staph. aureus*-Stämme)
- stimuliert. Soweit nicht anders beschrieben wurden die Zellen 20 Stunden stimuliert.

5.5 RNA-Isolierung: Methode nach Chomczynski and Sacchi, 1987 (modifiziert)

Die isolierte Fettzellsuspension wird im Verhältnis 1:1 mit Solution D versetzt, um die Lyse der Zellen zu erzielen. So z.B. 800 µl Solution D für die gleiche Menge an Adipozytensuspension (auf diese Ausgangsmenge beziehen sich auch die weiter aufgeführten Werte). Um die Adipozyten vollständig zu lysieren, wird das Lysat ca. 30 Minuten lang bei 4° C geschüttelt. Dabei geben die Zellen ihr Fett ab, welches bei 4° C den sog. „fat cake“ bildet, der entfernt werden kann. Der Rest kann weiter verarbeitet oder bei –20° C aufbewahrt werden. Die weitere Prozedur beinhaltet folgende Schritte:

1. Zugabe von 80 µl 2M Natriumacetat pH 4, vorsichtig mischen
2. 800 µl wassergesättigtes Phenol (Roth) für die Extraktion der RNA
3. Zugabe von 160 µl Chlorophorm/Isoamylalkohol 49:1 v/v zum Lysat
Gefäß kippen, dann für 20 Sekunden vortexen, bis sich eine weiße Emulsion gebildet hat. Falls nötig, noch Chloroform/IAA dazugeben, z.B. 40 µl und wieder vortexen
4. mindestens 15 min auf Eis inkubieren
5. 15 min bei 13.000 U/min bei 4° C (Centrifuge 5417, Eppendorf) zentrifugieren, um die Phasen zu trennen
6. 800 µl der oberen RNA-haltigen durchsichtigen Phase in ein neues Tube übertragen, ohne dabei die Inter-Phase zu berühren
7. 800 µl Isopropanol dazugeben, um die RNA zu fällen (1. Fällung), mischen und für mindestens 1 Stunde bei –20° C inkubieren
8. 15 min bei 13.000 U/min zentrifugieren
9. Supernatant mit einer Pipette entfernen, die letzten Tropfen mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe
10. Pellet in 300 µl Lösung D auflösen, dabei mehrmals herauf und herunter pipettieren, bis sich das Pellet ganz aufgelöst hat
11. 5 min bei 55° C inkubieren, kurz auf- und abpipettieren und weitere 5 min bei 55° C inkubieren
12. 300 µl Isopropanol dazugeben, mixen und für 1 Stunde bei –20° C inkubieren (2. Fällung)
13. 15 min bei 13.000 U/min zentrifugieren
14. Supernatant entfernen
15. 300 µl 80% Ethanol (mit DEPC-H₂O) zum Pellet hinzugeben, kurz vortexen

16. 7 min bei 13.000 U/min zentrifugieren

17. Supernatant entfernen

18. Pellet in 100 µl DEPC-H₂O (Diethylpyrocarbonat-behandeltes Wasser) auflösen, dabei mehrmals auf und ab pipettieren

19. 7 min bei 56°C inkubieren, auf und ab pipettieren und weitere 7 min bei 56°C inkubieren

Schliesslich wird die RNA 1:50 mit TE-Puffer verdünnt (z.B. 2 µl RNA + 98 µl TE-Puffer und die Konzentration bei 260nm photometrisch bestimmt:

(1 O.D._{260nm} RNA entspricht 40 µg/ml)

$$\frac{\text{O.D.} \times 40 \times 50}{100} = \mu\text{g/ml}$$

Solution D: (50ml)

4 M Guanidiniumthiocyanat → 23,63 g

25mM Na-Citrat pH 7.0 → 1,66 ml 0,75M Na-Citrat pH 7.0

0,5 % Sarcosyl → 2,5 ml 10% Sarcosyl

0,1 M β-Merkaptoethanol → 0,36 ml 14,3 M β-Merkaptoethanol (=100%)

+ ddH₂O bis auf 50 ml

β-Merkaptoethanol immer kurz vor Gebrauch dazugeben!

DEPC-H₂O:

0,1% DEPC (50µl DEPC in 50 ml ddH₂O)

1 h bei 37°C und dann für 15 min bei 15 psi (1,05kg/cm³) autoklavieren (liquid cycle)

TE-Puffer:

Tris-HCl, pH 8 oder 7,4 10 mM

EDTA, pH 8 1 mM

5.6 DNase-Behandlung der RNA (zur Entfernung kontaminierender genomischer DNA)

DNase-Reaktionsgemisch (7,5 µl):

10x DNase Puffer (Promega)	5,0 µl
RNAse Inhibitor (RNAsin 10000 U; Promega)	1,0 µl
DNase (1 U/µl) (Promega)	0,5 µl
DTT 0,1 M	1,0 µl

Man setzt ca. 3,5 µg RNA ein, entsprechendes Probenvolumen mit DEPC-H₂O auf 42,5 µl auffüllen, evtl. ca. 3,5 µg einrotieren (SpeedVac), mit DEPC-H₂O auf 42,5 µl auffüllen und die 7,5 µl vom Reaktionsgemisch dazugeben, sodass das Gesamtvolumen jeder Probe 50µl beträgt. Danach 60 min bei 37°C im Wärmeblock inkubieren. Die weiteren Schritte sind die folgenden:

1. 250µl DEPC-H₂O hinzugeben
2. gleiches Volumen (hier 300 µl) saures Phenol/Chloroform (untere Phase) dazu pipettieren (Firma Roth)
3. die Proben vortexen und 5 min auf Eis stehen lassen
4. 10 min bei 12.000 g und 4 °C zentrifugieren
5. den Überstand in neue Tubes übertragen und 280 µl Chloroform/Isoamylalkohol (1:49) dazugeben
6. die Proben 15 sek. vortexen und 5 min auf Eis stehen lassen
7. 5 min bei 4 ° C zentrifugieren
8. den Überstand in neue Tubes abpipettieren und 200 µl Ether (Roth) dazu geben
9. die Proben vortexen und 2 min bei 12000g zentrifugieren
10. den Überstand mit der Wasserstrahlpumpe absaugen
11. 200µl Ether erneut dazugeben
12. vortexen und 2 min zentrifugieren
13. den Überstand mit der Wasserstrahlpumpe abziehen
14. 2 µl Glykogen (10µg/µl; Roche) pro Tube pipettieren
15. je nachdem wie viel Probe sich noch im Tube befindet, z.B. 150 µl, ca. 15µl 3M Natriumacetat dazu geben
16. 15 sek. vortexen und die 2,5fache Menge an 100%igem Ethanol dazugeben und mischen
17. bei -80°C für mindestens 1 Std. lagern
18. 30 min bei max. Geschwindigkeit zentrifugieren und Pellet in DEPC-H₂O auflösen

5.7 Analytische RNA-Gelelektrophorese

Die Qualität einer RNA-Präparation wurde (meistens noch nach der DNase Behandlung der RNA) durch Auftrennung auf einem 1%-igen Agarosegel in 1 x MOPS-Laufpuffer beurteilt. Dazu werden 1-3 µg der Gesamt-RNA in einer Vakuumzentrifuge (SpeedVac) getrocknet und anschließend in 20 µl Ladepuffer aufgenommen. Die RNA wird 15 min bei 65°C denaturiert und im Gel bei einer elektrischen Feldstärke von 7 V/cm für ca. 1 h aufgetrennt. Das Gel wird auf einem UV-Transilluminator (254 nm) fotografiert. Das Vorhandensein intakter 28S-, 18S- und 5S rRNA wird als Kriterium für eine gute RNA-Qualität herangezogen.

MOPS-Puffer (10x): (MOPS = 3-(N-morpholino)-propansulfonsäure)

41,8g MOPS bis auf ca. 700 ml ddH₂O auffüllen

+ 20 ml 1M Na-Acetat

+ 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8)

mit 2N NaOH auf pH 7,0 einstellen und auf 1 Liter auffüllen

Ladepuffer:

je Probe (20µl Gesamtvolumen)

Formamide: 10µl

Formaldehyd 37%: 4µl

10x MOPS: 2µl

Ethidiumbromid 1mg/ml: 1µl

3µl Bromphenolblau 5% (w/v) 3µl

5.8 Reverse Transkription

Für die RT-PCR benötigt man ca. 2,5µg RNA für jeweils die RT+ und RT- (Probe entsprechend auf 10 µl mit DEPC-H₂O auffüllen). Hinzu kommen:

10µl RNA-Probe

+ 1µl Oligo-dT's

+ 1µl dNTP (10mM)

Die Proben werden bei 65° C für 5 min inkubiert und anschliessend sofort für mindestens 1 Minute auf Eis gelegt. Als nächstes gibt man dazu:

+ 4µl 5x first strand buffer (Invitrogen)

+ 2 µl 0,1 M DTT

mischen

42° C für 2 min

+ 1µl Superskript (200 U/µl; Gibco) bei den RT+ Proben (bei den RT- Proben ddH₂O stattdessen)

42° C für 50 min

70° C für 15 min

bei -20° C aufbewahren

5.9 Qualitative Reverse Transkription-PCR

Die PCR-Bedingungen für HNP1 und HD5 waren Denaturierung für 75 Sekunden bei 95°C, Annealing für 60 Sekunden bei 57°C und Extension für 30 Sekunden bei 72°C für insgesamt 40 Zyklen.

Spezifische Primer für das HNP1 waren:

5'-TCCCCAGAAGTGGTTGTTTCC-3' und 5'-GCAGAATGCCCAGAGTCTTC-3'

(Produkt 161 bp)

Spezifische Primer für HNP5 waren:

5'-AAGCAGTCTGGGGAAGACAA-3' und 5'-GCTGTCGCTGAGCTTCCTAG-3'

(Produkt 198 bp)

2. Primer-Paar für HNP5:

5'-ACCTCAGGTTCTCAGGCAAG-3' und 5'-CCAAAGCAGTGCAAGATTCA-3'

Für eine 25 µl Probe mit 2 µl cDNA Einsatz:

ddH ₂ O:	16,0 µl
10x PCR Puffer (Invitrogen)	2,5 µl
1,25 mM dNTP:	4,0 µl
10 pMol Primer:	0,25 µl
10 pMol Anti-Primer:	0,25 µl
Ampli-Taq (5 U/µl; Invitrogen):	0,125 µl
<hr/>	
	~23,0 µl
+ 2,0 µl cDNA	

Die RT-PCR wurde im „Robo Cycler Gradient 96 Stratagene“ für 40 Zyklen bei 57° C durchgeführt. Für jede der Proben ist eine β-Aktin Kontrolle mitgelaufen (361 bp).

5.10 Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Gel-Giessen: Vorbereiten eines 2%-igen Agarose-Gels in 1x TBE mit 2 µg Ethidiumbromid pro 100 ml TBE (von einer 10 mg/ml Ethidiumbromid-Stocklösung)

Nach Polymerisation des Gels wird dieses in die BioRad Elektrophoresekommer eingesetzt, welche mit 1x TBE-Puffer -versetzt mit 2µg Ethidiumbromid pro 100 ml Puffer- gefüllt wird. In die Taschen werden 20 µl des RT-PCR Produktes aufgetragen. Das Gel läuft bei 120 V.

10 x TBE-Puffer:

Tris	108 g
Borsäure	55 g
EDTA, pH 8, 0,5 M	40 ml
	ddH ₂ O ad 1 l

6x DNA-Ladepuffer: (bei 4 °C aufbewahren)

0,25 % (w/v) BromphenolBlau

0,25 % (w/v) Xylencyanol

40 % (w/v) Glycerol in ddH₂O

5.11 Sequenzierung der DNA

Für die Sequenzierung der PCR-Produkte musste die cDNA aus dem Elektrophoresegel unter Verwendung des QIAquick Gel Extraktion Kit (Qiagen) extrahiert werden. Dazu werden die gewünschten PCR-Banden unter dem kurzwelligen UV-Licht ausgeschnitten, um Mutationen in der DNA zu vermeiden.

Die Gelausschnitte werden gewogen und daraufhin 3 Teile QG Puffer auf 1 Teil Gel gegeben (z.B. 90 µl Puffer entsprechend 30 mg Gel)

Es folgt eine Inkubation bei 50° C für 10 min mit zwischenzeitlichem Vortexen.

Im Anschluss wird 1 Teil Isopropanol (z.B. 30 µl Isopropanol entsprechend 30 mg Gel) zur Probe gegeben und gevortext, woraufhin die Proben auf die Qiagen-Säulen pipettiert und 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert werden.

750µl PE-Puffer werden zum Waschen auf die Säule pipettiert und die Säule für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, auch ein zweites Mal, diesmal ohne Puffer-Zugabe.

Schliesslich werden 30µl EB Puffer (basisch) auf die Säule pipettiert und die Säule wieder 1 min lang bei 13.000 rpm zentrifugiert.

Zu 3 µl von dem so gewonnenen Eluat werden dazugegeben:

+ 4 µl des sog. „BigDye“ Sequenzieransatzes aus dem BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit Version 2.0 (PE Biosystems)

+ 3 µl jeweils vom Sense- und vom Antisense-Primer in der Konzentration von 1pMol.

Im Anschluss im „PE Big Dye Programm“ des PCR-Cyclers laufen lassen (96 °C 10sec, 50 °C 5 sec, 60 °C 4 min, 25 Zyklen). Die Reaktion verläuft auf der Basis des sog. „cycle sequencing“, bei dem die Matrizie auf Grund von Denaturierungsschritten mehrfach für die Sequenzierung verwendet wird und eine „lineare“ Amplifikation der Sequenzierprodukte erfolgt.

Zu 10 µl des PCR-Ansatzes werden schliesslich 90 µl TE-Puffer, 10 µl 3M Na-Acetat pH 7 und 300 µl 100% Ethanol zur Fällung dazupipettiert und 15 min auf Eis inkubiert (wahlweise –20°C über Nacht).

Dann wird das Gemisch 15min lang bei 13.000 zentrifugiert, das Pellet mit 100 µl 80% Ethanol gewaschen und nochmals 5 min zentrifugiert.

Schliesslich wird es 15 min in der Speed Vac getrocknet. Die weiteren Schritte inkl. Sequenzdetektion wurden von der Firma MediGenomix unternommen.

MediGenomix GmbH

Lochhamerstr. 29 82152 Planegg

Martinsried

sequenzierung@medigenomix.de

Die von Medigenomix ermittelte Nukleotidsequenz wurde mit dem Standard NCBI nucleotide-nucleotide blast program verglichen („geblastet“ (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)).

5.12 Quantitative Reverse Transkriptase-PCR (TaqMan)

Die Taqman PCR ist ein automatisierter PCR-Assay, bei dem die Amplifikation und der Nachweis des PCR-Produktes simultan ermöglicht werden. Bei dieser sogenannten “Real-Time“- PCR wird bei den zu quantifizierenden Proben das entstehende Amplifikat nach jedem Zyklus über ein Fluoreszenzsignal-übermittelndes System detektiert. Die Ausgangsproben können anschließend über den logarithmisch dargestellten Verlauf der PCR innerhalb der exponentiellen Phase miteinander verglichen und der Expressionslevel des untersuchten Gens bestimmt werden.

Bei der Detektion durch die fluoreszenzmarkierte, genspezifische Sonde wird die 5′-3′-Exonuklease-Aktivität der Taq DNA Polymerase genutzt. Im ersten Schritt der PCR hybridisieren die spezifischen Primer und die fluoreszenz-markierte Sonde an den Matrizen-Strang. Die Sonde ist am 5′-Ende mit einem sog. Reporter-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat) markiert, deren Fluoreszenz von einem sog. Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) am 3′-Ende aufgrund der räumlichen Nähe unterdrückt wird. Bei der Extension verdrängt die Taq Polymerase die Sonde, die durch die 5′-3′- Exonuklease-Aktivität hydrolysiert wird. Dabei wird der Reporter-Farbstoff abgetrennt und kann nun ein Fluoreszenzsignal erzeugen.

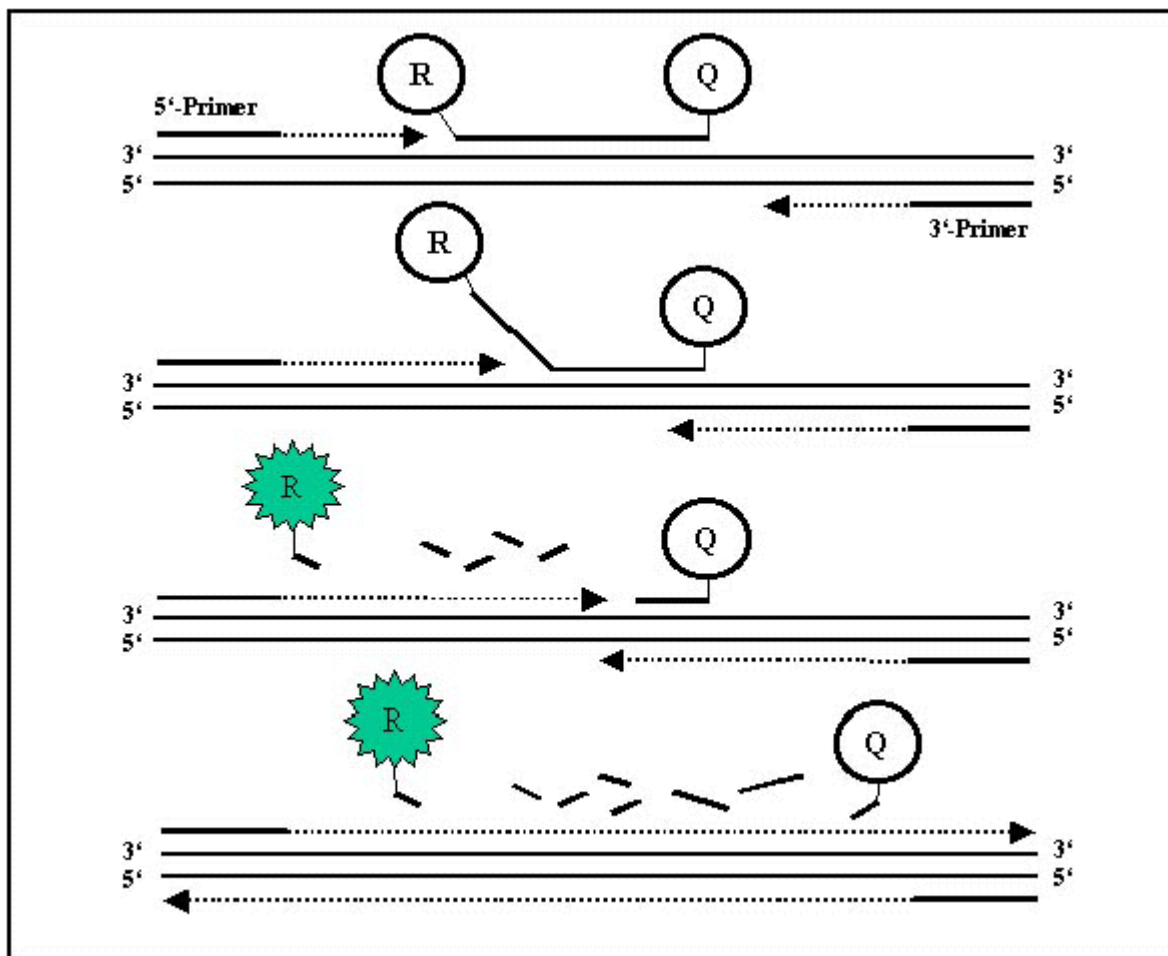


Abbildung 5: Prinzip der Taqman-PCR basierend auf der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq Polymerase. Bei der Extension wird der Reporter-Farbstoff (R) vom Quencher-Farbstoff (Q) abgespalten und erzeugt ein Fluoreszenzsignal (Einzelheiten im Text).

Im Falle einer 100% Effizienz der PCR müsste sich mit jedem Zyklus die Amplifikatmenge und analog dazu das Fluoreszenzsignal einer Probe verdoppeln. Die Effizienz der PCR eines bestimmten Amplifikates lässt sich durch die Erstellung einer Standardkurve aus unterschiedlichen Verdünnungsstufen einer Kontrollprobe bestimmen. Nach der Taqman-PCR wird das Fluoreszenzniveau bzw. die entstehende Amplifikatmenge in einer logarithmischen Funktion gegen die Zyklenzahl dargestellt. Als Maß zur Quantifizierung der Ausgangsmenge des genspezifischen Templates wird der CT-Wert definiert. Dieser Wert gibt für jede cDNA-Probe an, bei welcher Zykluszahl in der exponentiellen Phase ein vorher definiertes Fluoreszenzniveau (Basislinie) erreicht wird. Zum Vergleich der Expression eines Gens in unterschiedlichen cDNA-Proben wurde eine relative Quantifizierungsstrategie

gewählt. Dabei werden nicht die absoluten Kopienzahlen oder Konzentrationen bestimmt, sondern die Expression des zu untersuchenden Gens wird auf ein zweites, ubiquitär homogen exprimiertes Gen bezogen. Diese sogenannten "Housekeeping"-Gene wie GAPDH oder β -Aktin dienen zur Normalisierung verschiedener Proben. Die relative Expression des zu untersuchenden Gens in den experimentellen Proben wird auf ein Standard-Probenmaterial = (Kalibrator) bezogen. Die mathematische Kalkulation der Expression erfolgte durch die $\Delta\Delta$ CT-Methode. Dabei wird im ersten Schritt für jede experimentelle Probe der CT-Wert des Referenzgens (z.B. GAPDH) vom CT-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert (Δ CT). Nach dieser Normierung wurden von den Δ CT-Werten der experimentellen Proben der Δ CT einer Standard-Probe abgezogen ($\Delta\Delta$ CT). Der relative Expressionslevel einer Probe normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe ergibt sich aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Die TaqMan-PCR wurde im TaqMan ABI 7700 Sequence Detection System (PE Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) durchgeführt. Jede 20 μ l Reaktion enthielt 2 μ l cDNA, 10 μ l 2x PCR master mix (Applied Biosystems Nr:4318157), 1 μ l (bestehend aus forward und reverse primer und der TaqMan probe) des jeweiligen Assay by Design (Defensin 1) und Assay on Demand (Defensin 5) und 7 μ l H₂O. Nach anfänglichen 2 Minuten bei 50 °C und 10 Minuten bei 95°C, folgten 40 Zyklen bei 95°C für 15 Sekunden und 60°C für 60 Sekunden. Die Reaktion wurde für jede Probe in zweifacher Ausführung durchgeführt.

Die Sequenzen der verwendeten Primer waren die folgenden:

Assay by Design (anhand der Sequenzen der Genbank database) α -Defensin 1: Primer und Sonden, Exongrenze 1/2 überspannend

hDEFENSA1-EX1F CCTTGCATGGGACGAAAGCT

hDEFENSA1-EX1R GCACGCTGGTATTCTGCAAT

hDEFENSA1-EX1M2 FAM-CTTGAGCCTGGATGCTTT

Assay on Demand α -Defensin 5 von Applied Biosystems (order number: Hs00360716_m1) Exongrenze 1/2 überspannend

Core sequence: CTTAGAACCTCAGGTTCTCAGGCAA

Oligonucleotid Primer und Taqman probes für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und rRNA als Kontrollen stammen von der Firma Applied Biosystems.

Die Reagenzien der Assays amplifizieren keine unspezifischen genomischen DNA Proben. Kontrollen mit ddH₂O waren negativ in allen Läufen. Zudem waren die meisten Proben nach der RNA-Extraktion mit DNase vorbehandelt.

5.13 Präparation von Plasmid-DNA

Das Plasmid pBlueskriptII S/K enthält die cDNA des humanen HD5-Gens und wurde uns freundlicherweise von Chuck L. Bevins zur Verfügung gestellt.

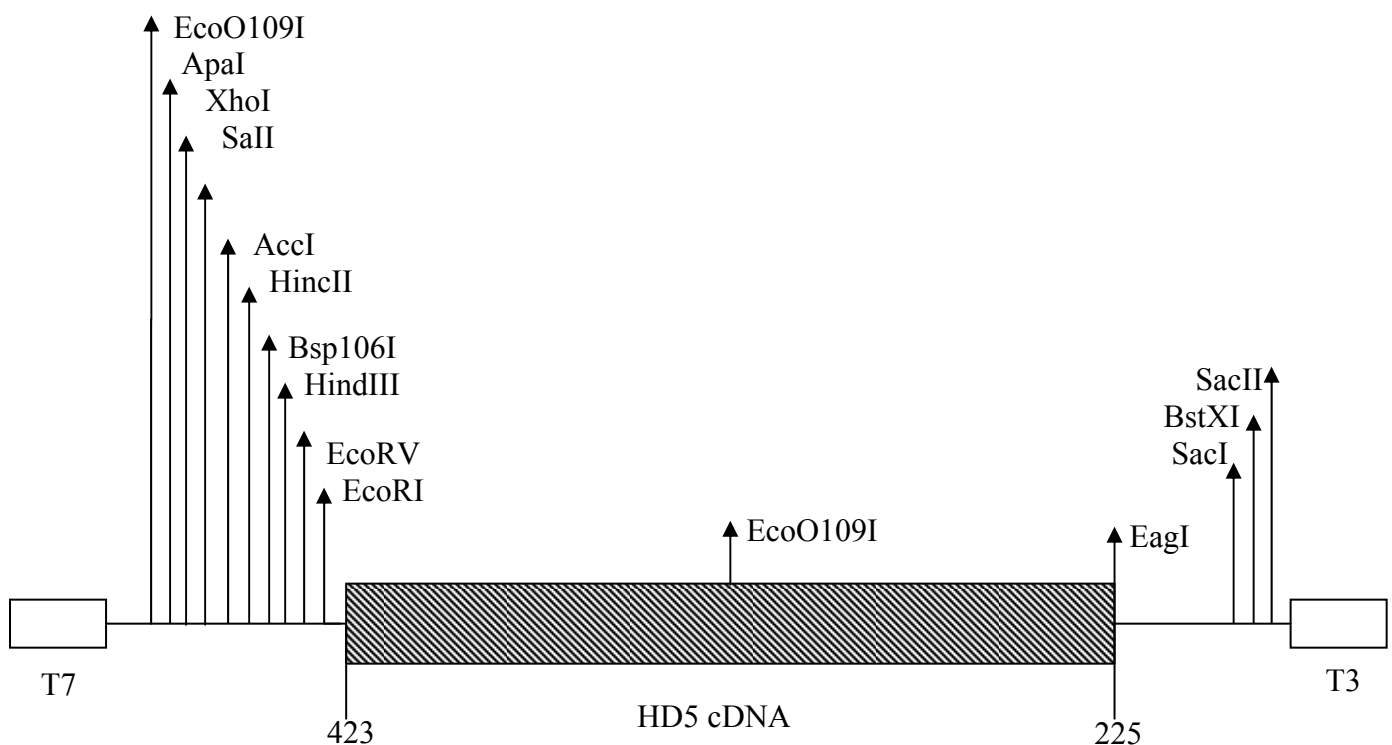


Abbildung 6: Das Plasmid pBlueskriptII S/K

50 ng der Plasmid cDNA wurden zur Vermehrung zu 50µl kompetenter E.coli's (DH5α) (Stock 100ng/µl) gegeben und 30 Minuten lang auf Eis inkubiert. Anschliessend folgte die Elektroporation mit dem Biorad gene pulser apparatus bei 1,8 Kvolt. Zu den elektroporierten Zellen wurde dann 1 ml SOC Medium gegeben und das Gemisch für 1 Stunde bei 37°C geschüttelt, um die Replikation zu ermöglichen. Davon wurden 50 µl auf eine LBamp Platte

(100µg Ampicillin/ml) ausgestrichen und bei 37°C für mindestens 16 Stunden inkubiert, um die Selektion der Klone zu ermöglichen, welche das Plasmid inkorporiert hatten. Einzelne Kolonien wurden daraufhin zu 5 ml LBamp Medium zur Inokulation hinzugefügt und wuchsen 8 Stunden lang bei 37°C unter schnellem Schütteln bei 290 rpm. Glycerol Stocks wurden daraufhin fertiggestellt indem 500µl dieses Mediums mit 500µl 100% Glycerol gemischt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt wurden. Zur Plasmidpreparation wurden dagegen 10µl der vorkultivierten Zellen in 25 ml LBamp Medium über Nacht bei konstantem Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden die kultivierten Bakterien bei 3800 rpm für 30 Minuten pelletiert. Die weiteren Schritte der Plasmidpräparation wurden nach den Angaben des Midiprep Qiagen Protokolls (Qiagen) durchgeführt.

Die Plasmidisolation mit Hilfe des Qiagen Plasmid Midi Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland) basiert auf einer alkalischen Lyseprozedur gefolgt von der Bindung der Plasmid-DNA auf das QIAGEN Anionentausch Resin unter entsprechenden niedrigen Salz- und pH-Bedingungen. RNA, Proteine und Farbstoffe niedrigen Molekulargewichtes werden durch Waschen entfernt. Plasmid DNA wird in einem hochprozentigen Salzpuffer eluiert und mittels Isopropanol Fällung konzentriert und von den Salzen befreit.

Das Pellet wurde in 250 µl 0,25mM Tris-HCl, pH 8,5 gelöst und bei 4°C über Nacht aufbewahrt.

Das Plasmid wurde bei 260nm photospektrometrisch quantifiziert und 30µg davon im 25 °C Wasserbad über Nacht linearisiert. Die dafür verwendeten Restriktionsenzyme waren EcoRI und SacI (Puffer A). Auf einem 1,2%igen Agarosegel wurden sowohl die durch Restriktionsverdau entstandenen linearisierten Plasmide kontrolliert als auch die unverdauten überprüft.

LB-Medium für die Kultur von E. coli

Trypton → 10 g

Hefeextrakt → 5 g

NaCl → 10 g

H₂O^{MP} ad 1 l

LB-Agarplatten für die Kultur von E. coli

Trypton → 10 g

Hefeextrakt → 5 g

NaCl → 10 g

Bactoagar → 15 g

H₂O^{MP} ad 1 l

Ampicillinhaltige Medien und Agarplatten für die Kultur von E. coli

Ampicillin (Roche) wurde als Stammlösung mit 50 mg/ml in 70 % Ethanol bei –20 °C aufbewahrt. Die verwendete Endkonzentration war 100 µg/ml.

SOC medium

Hefeextract → 0,5%

Trypton → 2%

NaCl → 10 mM

KCl → 2,5 mM

Mg Cl₂ → 10 mM

MgSO₄ → 10 mM

Glukose → 20 mM

In H₂O^{MP}

5.14 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der RNA erfolgte auf einem Gel mit 1 % Agarose und 6 % Formaldehyd in 1 x MOPS-Laufpuffer. Für ein Gel (14,5 cm x 14,0 cm x 0,5 cm) wurde 1g Agarose in 74 ml H₂O^{MP} und 10 ml 10 x MOPS-Puffer durch Aufkochen vollständig gelöst, im Wasserbad auf 60 °C äquilibriert und nach Zugabe von 16 ml 37%igem Formaldehyd in die Gelkammer gegossen. Zur Vorbereitung der Proben wurden jeweils 5-15 µg der Gesamt-RNA in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, in 20 µl Ladepuffer für denaturierende RNA-Agarosegele

(siehe unten) aufgenommen und für 15 min bei 65 °C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte für 1,5 h bei 120 V.

Ladepuffer für denaturierende RNA-Agarosegele

je Probe (20 µl Gesamtvolumen):

Formamid	10,0 µl
Formaldehyd, 37 %	3,25 µl
MOPS-Puffer, 10 x	2,0 µl
Bromphenolblau-Lösung, 5 % (w/v)	0,3 µl
H ₂ O ^{MP}	4,45 µl

5.15 Northern-Blot (Transfer der RNA)

Um die elektrophoretisch aufgetrennte RNA durch Hybridisierung mit einer Sonde analysieren zu können, wurde sie mit Hilfe eines Kapillarblots auf eine Nylonmembran transferiert. Als Transferpuffer wurde 10 x SSC (siehe unten) verwendet. Nylonmembran (GeneScreen, DuPont), RNA-Agarosegel und Chromatographie-Papier (Whatman 3MM) wurden für einige Minuten in 10 x SSC äquilibriert. Der Aufbau des Blots erfolgte wie in „Current Protocols in Molecular Biology“ [Ausubel et al., 1994] beschrieben. Der Transfer erfolgte über Nacht. Nach Beendigung des Transfers wurde die Nylonmembran für 5 min in 10 x SSC geschwenkt, 1 h luftgetrocknet und 1 h bei 80 °C gebacken. Die RNA wurde durch UV crosslinking auf der Membran fixiert (50 mJoule, GS GeneLinker, Bio-Rad).

20 x SSC Puffer

NaCl → 175 g/l

Na₃Citrat*2H₂O → 88 g/l

HCl ad pH7

5.16 Herstellung radioaktiv markierter Sonden

Radioaktiv markierte Sonden wurden nach der random oligonucleotide priming-Methode [Feinberg and Vogelstein, 1983] hergestellt. Sie ermöglicht eine einfache und schnelle Markierung beliebiger DNA-Sequenzen. Dazu werden Hexanucleotide (random primers) an denaturierte DNA hybridisiert, und durch die DNA-Polymerase I werden in Gegenwart radioaktiver Nucleotide neue DNA-Stränge synthetisiert. Es wurden die Reagenzien des „Prime It II Random Primer Labeling Kit“ verwendet. Die Markierungsreaktion erfolgte nach den Angaben der Firma Stratagene.

Zur Herstellung einer HDefensin 5-spezifischen Sonde wurde ein circa 200 bp langes EcoRI/SacI-Fragment der humanen Defensin 5-cDNA aus dem Plasmid pBlueskriptII S/K als template verwendet. Die Fragmente wurden durch Auftrennung in einem präparativen low melting point-Agarosegel gereinigt.

5.17 Hybridisierung [Church and Gilbert, 1984]

Die Membran wurde mit der „RNA-Seite“ nach innen in eine mit Wasser gefüllte Hybridisierungsröhre (15 cm Länge, 4 cm Durchmesser) überführt und luftblasenfrei an die Wand der Röhre angelegt. Das Wasser wurde durch 35 ml Hybridisierungsmix (70 °C) (siehe unten) ersetzt und die Membran wurde unter Rotation in einem Hybridisierungssofen bei 65 °C für mindestens 1 h prähybridisiert, um unspezifische Bindungen abzusättigen.

Die Sonde (4.16) wurde für 5 min bei 95 °C denaturiert und in 15 ml vorgewärmte Hybridisierungslösung (70 °C) überführt. Die Prähybridisierungs-Lösung wurde abgegossen und zügig durch die sonden-haltige Hybridisierungslösung ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte unter Rotation bei 65 °C für mindestens 8h.

100 x Denhardt-Lösung

Ficoll, Typ 400 (Pharmacia) 20 g/l

Polyvinylpyrrolidon K90, 360.000 (Fluka) 20 g/l

BSA, Fraktion V (Roche) 20 g/l

Hybridisierungsmix

Denhardt-Lösung 5x

SSC-Puffer 5x

SDS 1 %

Fischsperma-DNA (Roche) 0,1 mg/ml

5.18 Waschen der Membran und Exposition

Unspezifisch gebundene Sonden-Moleküle wurden nach der Hybridisierung durch mehrere Waschschrte entfernt. Die Hybridisierungslösung wurde abgekippt und die Membran wurde in der Röhre zweimal mit je 200 ml Waschpuffer 1 (70 °C) gewaschen. Anschließend wurde die Membran aus der Röhre entnommen und zweimal in einem Schüttelwasserbad bei 65 °C in 300 ml Waschpuffer 1 für 30 min gewaschen. Waren danach mit einem Geiger-Müller-Zählrohr noch starke Hintergrundsignale meßbar, so wurde die Membran noch zweimal für 30 min bei 65 °C in 300 ml Waschpuffer 2 gewaschen.

Die Membran wurde in Haushaltsfolie eingeschlagen und für mehrere Stunden mit Kodak X-OMAT-Röntgenfilmen in Röntgenkassetten mit Verstärkerfolien (DuPont) exponiert.

Waschpuffer 1

SSC-Puffer (4.15)	1 x
SDS	0,2 %

Waschpuffer 2

SSC-Puffer (4.15)	0,2 x
SDS	0,2 %

5.19 Proteinisolierung

Um aus den isolierten Zellen (Adipozyten, Granulozyten) Proteine zu gewinnen, werden die Zellen in 4x Lysepuffer lysiert. Im Falle der Adipozyten, wird die Zellsuspension nach Zugabe des Lysepuffers 30 Minuten lang bei 4°C geschüttelt. Die aus den lysierten Zellen freigesetzten Lipide erstarren bei 4°C und bilden den sog. „fat cake“, der leicht entfernt werden kann. Um aus Duodenum Protein zu gewinnen wurden kleine Gewebeproben (ca. 0,3 g Gewebe) in 4x Lysepuffer mit Hilfe eines Mörsers homogenisiert.

5.20 Proteinkonzentrierung

Dafür wurden sowohl die Fällung mittels Aceton als auch mit Trichloressigsäure (TCA) durchgeführt.

TCA-Fällung:

Zur gewünschten Probenmenge wird 20% TCA bis zur Endkonzentration der Säure von 6% gegeben. Anschliessend wird für mehrere Stunden auf Eis inkubiert und 30 Minuten lang bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird mit eiskaltem Aceton gewaschen und 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Waschen mit Aceton und die 5-minütige Zentrifugation wird ein weiteres Mal wiederholt. Schliesslich wird das Pellet bei 95 °C getrocknet und im gewünschten Volumen eines Lyse-Puffers aufgelöst.

Herstellung von 100%iger (w/v) TCA: 500g TCA in 350ml ddH₂O auflösen, bei Raumtemperatur aufbewahren.

Aceton-Fällung:

1 Teil Probe mit 4 Teilen 80%igem Aceton vermischen, einige Male mixen und für mindestens 1 Stunde bei -20 °C inkubieren. Anschliessend bei 14000 g bei 4 °C und für 30 Minuten zentrifugieren, das Pellet lufttrocknen lassen und in der gewünschten Menge Lyse-Puffer auflösen.

5.21 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mit dem BioRad DC Protein Assay (Biorad) bestimmt. Dazu wird -je nach Anzahl der zu messenden Proben- eine Stocklösung aus Lösung A und Assay Reagent S im Verhältnis 50:1 angesetzt und 25 µl dieser Lösung zu 5µl jeder Probe dazugegeben. Anschliessend werden jeweils 200µl von der Lösung B dazugegeben, der Ansatz 15 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert und die Extinktion der Proben bei 600 nm gemessen. Zur Erstellung einer Eichkurve wurde eine BSA-Verdünnungsreihe (Fraktion V, Roche) angesetzt und die Konzentration der Proben bestimmt.

Alternativ wurde die BCA-Methode verwendet:

Um zu gewährleisten, dass einheitliche Proteinmengen auf eine SDS-PAGE geladen wurden, wurde ein BCA-Test mit den Zelllysaten durchgeführt. 50 µl der Proteinprobe wurden mit 950 µl fertigen BCA-Reagenzes (frisch angesetzt, Reagenz B 1:50 in Reagenz A verdünnt; Rierce, Rockford, USA) versetzt. Nach 30 Minuten Inkubation bei 65 °C wurde in einem Photometer bei 562 nm die Extinktion bestimmt. Der Proteingehalt wurde aus einer Kalibrierreihe ermittelt, die in einem Parallelansatz mit BSA in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 200 µg/ml erstellt wurde.

5.22 Western Blot Analyse

Die Vorbereitung für das Laden auf dem Gel beinhaltet die Zugabe von 4-fachem Laemmli-Puffer (Ladepuffer, Endkonzentration 1x) zum gewünschten Probenvolumen und das Kochen der Proben für 5 Minuten bei 95°C. Die Proben werden dabei nicht mit β-Merkaptoethanol versetzt, da die Beobachtung gemacht wurde (Daten nicht gezeigt), dass die in dieser Studie verwendeten Antikörper die mit β-Merkaptoethanol reduzierten Proben nicht erkennen. β-Merkaptoethanol spaltet Disulfidbrücken, was in diesem Fall wahrscheinlich mit einer Zerstörung des vom Antikörper erkannten Epitops einhergeht.

30µl jeder nicht-reduzierten Probe werden dann auf einem 10%-igen BisTris Gel (Invitrogen) aufgetragen. Als Marker wird der SeeBlue Plus 2 (Invitrogen) benutzt (7µl). Das Gel läuft ca.30 min bei 200 V in 1x MES running buffer (Invitrogen) im XCell II™ Blot module (Invitrogen). Es folgt der Transfer der Proteine vom Gel auf eine PVDF Membran mit der Porengröße 0,2µm (Invitrogen), welche 30 Sekunden lang in Methanol aktiviert wird. Für den

Transfer wird ein Transferpuffer (20x, Invitrogen), welcher mit 20 % Methanol versetzt ist, benutzt. Der Transfer (Blotting) dauert 20 Minuten im XCell II™ Blot module bei einer Stromstärke von 0,18 mA.

Nach dem Blotting kann das Gel zur Beurteilung der Transfereffizienz mit Coomassie gefärbt werden. Die Membran wird dabei in 5%-iger Trockenmilch in TBST für 1 Stunde bei 37°C inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Es folgen 3 Waschschrte in TBST für 5, 5 und 10 Minuten. Die folgende Inkubation mit den primären Antikörpern (monoklonaler Maus anti-HNP 1, BMA Switzerland, Verdünnung 1:2000 und polyklonaler Kaninchen anti-HD 5, Biotrend, Verdünnung 1:2000) dauert 1 Stunde bei Raumtemperatur und wird von 3 Waschschrten für 5, 10 und 10 Minuten gefolgt. Die Inkubation mit den sekundären Antikörpern (Kaninchen anti-Maus, DAKO Denmark, Verdünnung 1:5000 und Ziege anti-Kaninchen, ImmunoLabs, Verdünnung 1:10000 entsprechend) dauert 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Prozedur endet mit 2 Waschschrten in TBST (5, 10 Minuten) und 2 Waschvorgängen in TBS (10, 10 Minuten). Die Membran wird gemäß Vorschriften des ECL-Protokolls (Amersham Biosciences) entwickelt und mit einem Film (Kodak) für verschiedene Expositionszeiten inkubiert.

Lysepuffer (4x) :

4% NP-40, 300mM NaCl, 200mM Hepes, 4 mM EGTA (Sigma), 4 mM Na₃VO₄ (Fa. ICN), Proteaseninhibitor-«Cocktail» (Roche).

Alternativer Lysepuffer: 60mM TRIS + 10% SDS

« Weißer » Laemmli-Puffer (4x), 50ml :

1,25 M TRIS-HCl, pH 6,8 → 5,0 ml

Glycerol 87% → 11,6 ml

SDS → 2,0 gr

ddH₂O → ad 50 ml

Puffer:

TBS (10x):

24,22 g TrisBase

80g NaCl

auf 1000ml mit ddH₂O auffüllen und mit HCl auf pH 7,6 einstellen

TBST: TBS mit 0,05% Tween 20 (z.B. 1 lit 1x TBS + 0,5 ml Tween 20 → 1 lit 1x TBST)

Strippen der Membran: Membran nach einem kurzen Waschschrift in ddH₂O in 2% SDS in TBS für 30 Minuten. Anschliessend Waschen der Membran mit TBS für 30 Minuten, Blocken mit Milch und erneute Inkubation mit dem 2. Antikörper. Die weitere Prozedur wie weiter oben beschrieben.

5.23 Proteinfärbungen

Coomassie-Färbung:

Coomassie-Färber:

200 ml Methanol

50 ml Eisessig

250 ml ddH₂O

0,5 gr ServaBlue R (Serva)

Coomassie-Entfärber:

300 ml Methanol

100 ml Eisessig

600 ml ddH₂O

Das Gel 30 Minuten in Coomassie-Färbelösung färben, dann wieder entfärben bis die Proteinbanden gut sichtbar werden. Färben und Entfärben werden auf einem Taumler bei Raumtemperatur durchgeführt.

Ponceau S-Färbung:

5 g Ponceau (Roth) in 10 ml Eisessig und 990 ml ddH₂O lösen und die Western-Membran nach dem Transfer der Proteine vom Gel für 10 Minuten einfärben und mit ddH₂O entfärben. Färben und Entfärben werden auf einem Taumler bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Färbung kann vollständig abgewaschen werden, sodaß im Anschluß eine Immun-Detektion durchgeführt werden kann.

5.24 Immunohistochemie

Immunhistochemische Analysen wurden an 5µm Gefrierschnitten von Omentumgewebe mit Hilfe der Alkaline Phosphatase/Anti-Alkaline Phosphatase Methode durchgeführt. Die Gefrierschnitte wurden mit dem monoklonalen Mausantikörper gegen das humane α-

Defensin 1 bzw. dem Kaninchenantikörper gegen das humane α -Defensin 5 für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Diese beiden Antikörper sind dieselben, welche im Western Blot eingesetzt wurden.

Die Inkubation mit den entsprechenden sekundären Antikörpern erfolgte bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Die sekundären Antikörper waren ein Kaninchen anti-Maus Antikörper (Z259, verdünnt 1:40; DAKO) für das α -Defensin 1 oder ein Maus anti-Kaninchen Antikörper (M 737, verdünnt 1:50; DAKO) für das α -Defensin 5.

Es folgte eine weitere Inkubation mit einem Alkaline Phosphatase-spezifischen monoklonalen Mausantikörper (D651, verdünnt 1:40; DAKO) für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Alle Verdünnungen wurden in TBS (pH 7.6) durchgeführt.

Schliesslich wurden die Schnitte 15 Minuten lang der Färbelösung ausgesetzt.

Diese enthielt:

Natriumnitrit (28 mM)

basisches Fuchsin (21 mM)

Naphthol-AS-B1-Phosphat (0.5 M)

Dimethylformamid (64 mM),

und Levamisol (5 mM) in 50 mM Tris-HCl Puffer (pH 8.4) mit 164 mM NaCl.

Die Spezifität der HNP1-Färbung wurde durch Prä-Absorption mit dem synthetischen HNP1-Peptid bestätigt (0,5 μ g/ μ l, Bachem, Deutschland).

Silanisierung von Objektträgern:

2 x 5 min in Aceton

1 x 5 min in 245ml Aceton + 5 ml APES (APES = 3- Aminopropyl-Triethoxysilane)

2 x 5 min in ddH₂O

6. Ergebnisse:

6.1 PCR für das α -Defensin 1

Initial postulierten wir, dass Zellen in der Peritonealhöhle durch die Synthese von Peptiden mit antimikrobieller Aktivität (Defensinen) vor Infektionen schützen. Zu diesem Zweck haben wir ursprünglich PCR-Experimente mit Präparationen aus Omentum majus begonnen und mit Granulozyten als positive Kontrolle für das α -Defensin 1 verglichen. Am Anfang stand die Untersuchung der Fragestellung auf RNA-Ebene. Es wurde auf die qualitative als auch auf die quantitative TaqMan-PCR zurückgegriffen.

Die Gesamtpräparationen in diesen Experimenten waren positiv.

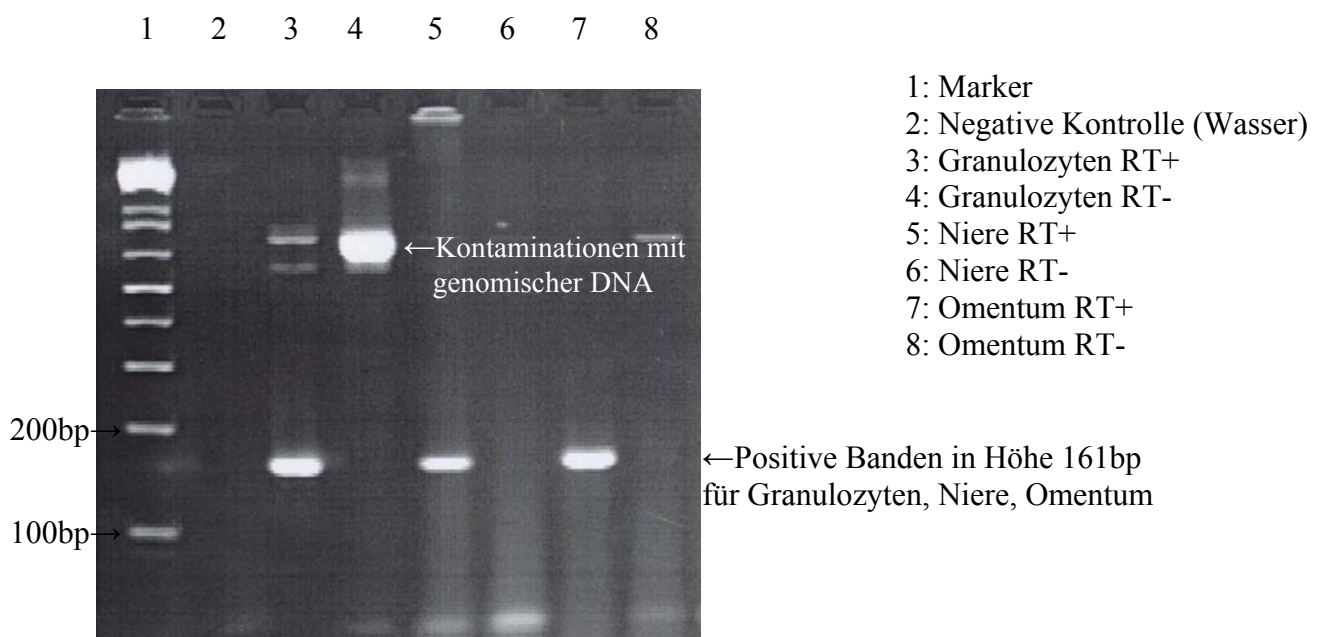


Abbildung 7: PCR für das α -Defensin 1

Die Beobachtung, dass die Gesamtomentumpräparationen in mehreren Durchläufen (Daten nicht gezeigt) positive Banden ergeben haben, weckte das Interesse dafür, den hierfür synthetisierenden Zelltyp zu identifizieren. Dies geschah in der Annahme, dass möglicherweise nicht der Granulozyt -bei dem das Vorhandensein von Defensinen bekannt

ist- dem gesuchten Zelltyp im Gewebekonglomerat entspricht.

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Mesothelzelle, die die Grenze des Omentum zur Peritonealhöhle bildet, eine defensinproduzierende Zelle darstellt. In den nächsten Experimenten wurden dementsprechend aus Omentum isolierte Mesothelzellen für die PCR verwendet.

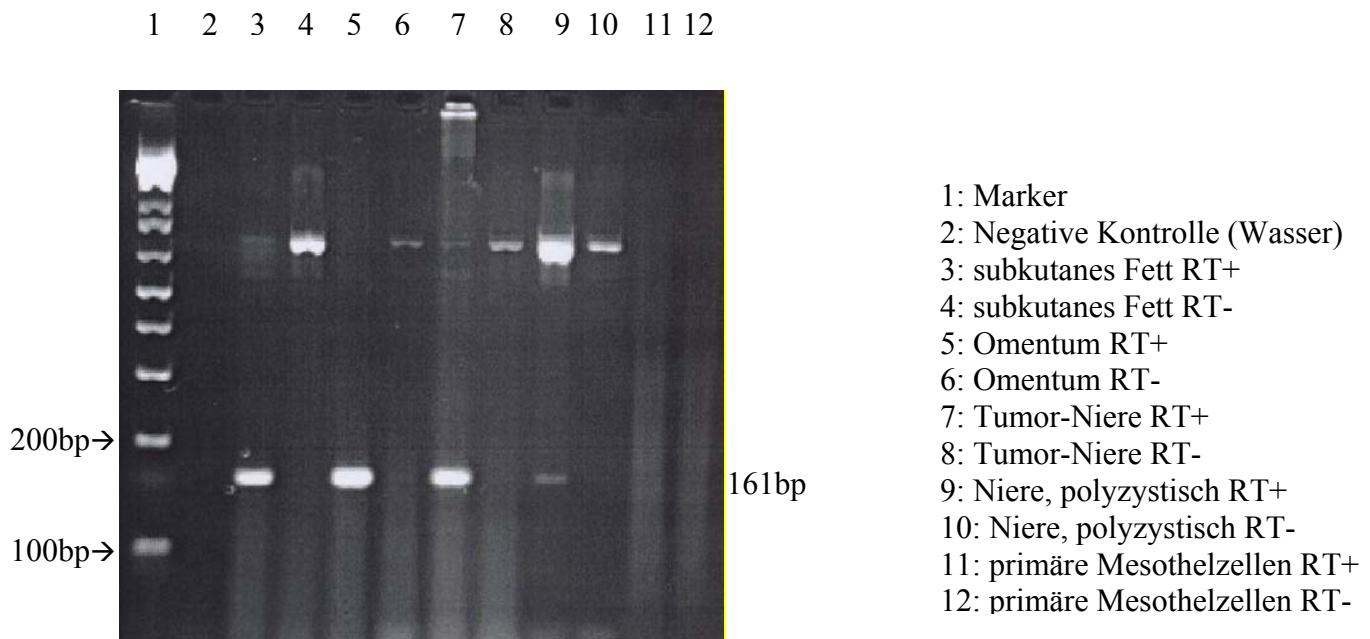


Abbildung 8: PCR für das α -Defensin 1

Wie aus der Abbildung ersichtlich erbrachten die Mesothelzellen keine positiven Banden. Auch auf Proteinebene ließ sich das α -Defensin 1 in Mesothelzellen nicht nachweisen (siehe Ergebnisse der Western-Blot-Analyse). Eine Literaturrecherche ließ uns postulieren, dass die Expression von Defensinen in Mesothelzellen regulierbar sein könnte (z.B. durch Isoleucin; Fehlbaum, 2000). Daraufhin folgten Experimente mit Isoleucin-stimulierten Mesothelzellen (DMEM ohne FCS, 12,5 μ g/ml L-Isoleucin), die jedoch ebenso negativ blieben. Somit erhärtete sich die Hypothese, dass der Adipozyt für die Defensinexpression verantwortlich ist. Aus diesem Grund verwendeten wir auch Präparationen aus subkutanem Fett für unsere Experimente. Zudem behandelten wir im weiteren cDNA Proben mit DNase, um Kontaminationen mit genomischer DNA -wie in den vorherigen Abbildungen zu sehen- zu verhindern.

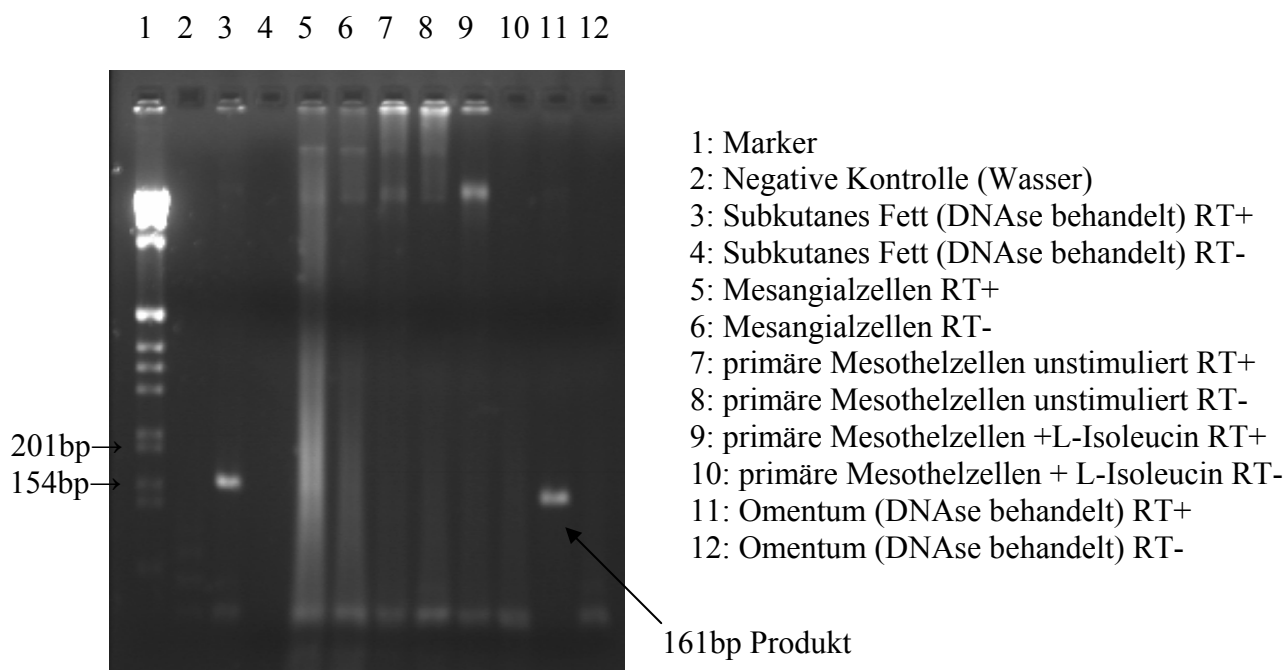


Abbildung 9: PCR für das α -Defensin 1

Die positiven Banden in den Gelen auf Höhe 161bp haben wir nach entsprechender Verarbeitung (siehe Material und Methoden) zu Medigenomix GmbH zur Sequenzierung geschickt. Dabei bestätigte sich das Ergebnis als humanes α -Defensin 1.

Nachdem auch Mesothelzellen negativ und auch RNA aus subkutanem Fett positive Banden in unserer PCR ergeben hat, wurde die Frage des Adipozyten als defensinsynthetisierende Zelle eine noch spannendere, vor allem wenn man bedenkt, dass Adipozyten ubiquitär vorkommende Zellen sind und gleichzeitig eine wachsende Anzahl von Studien eine Rolle von Fettzellen in der Immunabwehr belegen (siehe Einleitung „Das Fettgewebe“). Die weiteren Experimente und die vorliegende Arbeit haben sich letztendlich mit dieser Fragestellung beschäftigt.

Um die neu aufgestellte Hypothese überprüfen zu können und verlässliche Ergebnisse liefern zu können, mussten „reine“ Adipozyten aus Gesamtomentum (und subkutanem Fett) isoliert werden, eine Prozedur, deren Optimierung sich als langwierig und deren Durchführung sich als schwierig erwiesen hat.

Die RNA von isolierten Adipozyten wurde mit DNase behandelt und darauffolgend in cDNA

umgeschrieben (siehe Material und Methoden). Unter Verwendung von α -Defensin 1 spezifischen Primern ergab die RT-PCR deutliche Banden sowohl für Granulozyten (positive Kontrolle) als auch für Adipozyten. Tatsächlich ist es uns gelungen, für die isolierten „reinen“ Adipozyten positive Banden in der PCR für das α -Defensin 1 zu generieren, ein Erfolg, der sich in mehrfachen Versuchen wiederholen ließ.

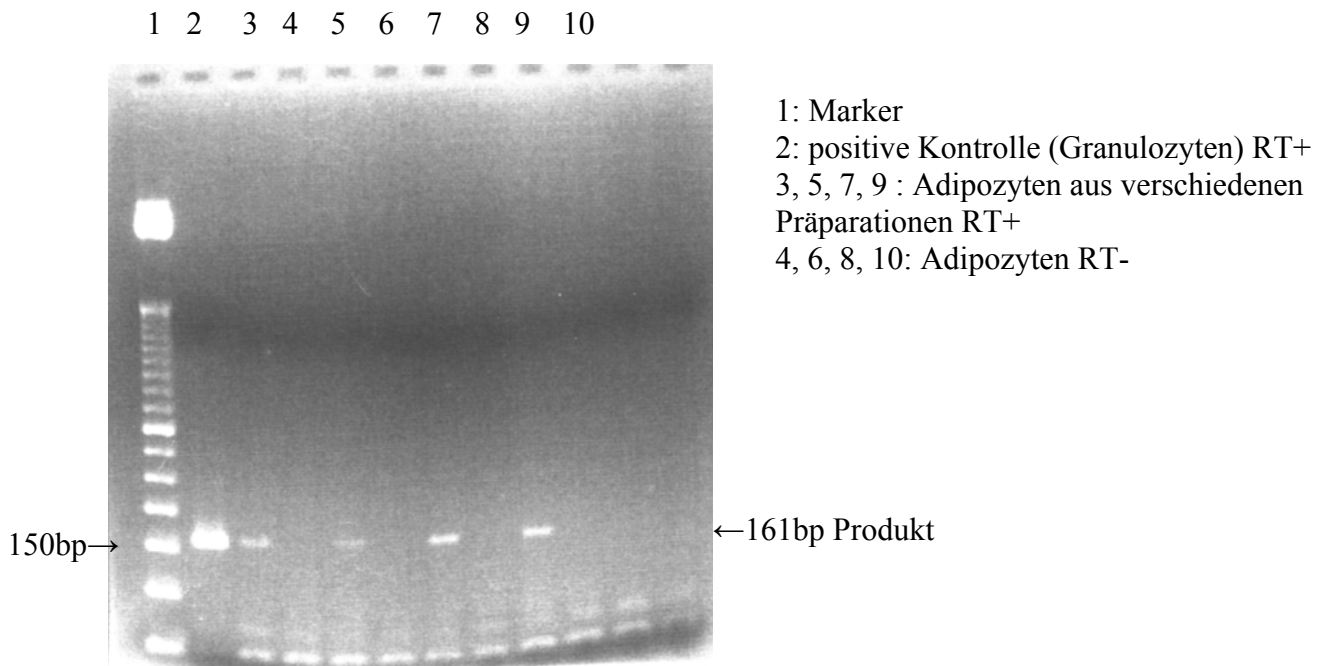


Abbildung 10: PCR für das α -Defensin 1

Die nächste Überlegung war es, isolierte Adipozyten mit Zytokinen zu stimulieren, um die Stimulierbarkeit ihrer Defensinexpression zu untersuchen. Anfangs wurde eine Kombination aus TNF- α und IFN- γ gewählt.

So wurde in der folgenden RT-PCR cDNA sowohl von unstimulierten Adipozyten als auch von Adipozyten, welche 12 Stunden lang mit 20ng TNF- α /ml DMEM (+ 1% FCS) und 40ng IFN- γ /ml Medium behandelt wurden, eingesetzt (Abbildung 1). Sowohl stimulierte als auch basale Adipozyten waren positiv für HNP1, es konnten jedoch in der qualitativen RT-PCR keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ausgemacht werden.

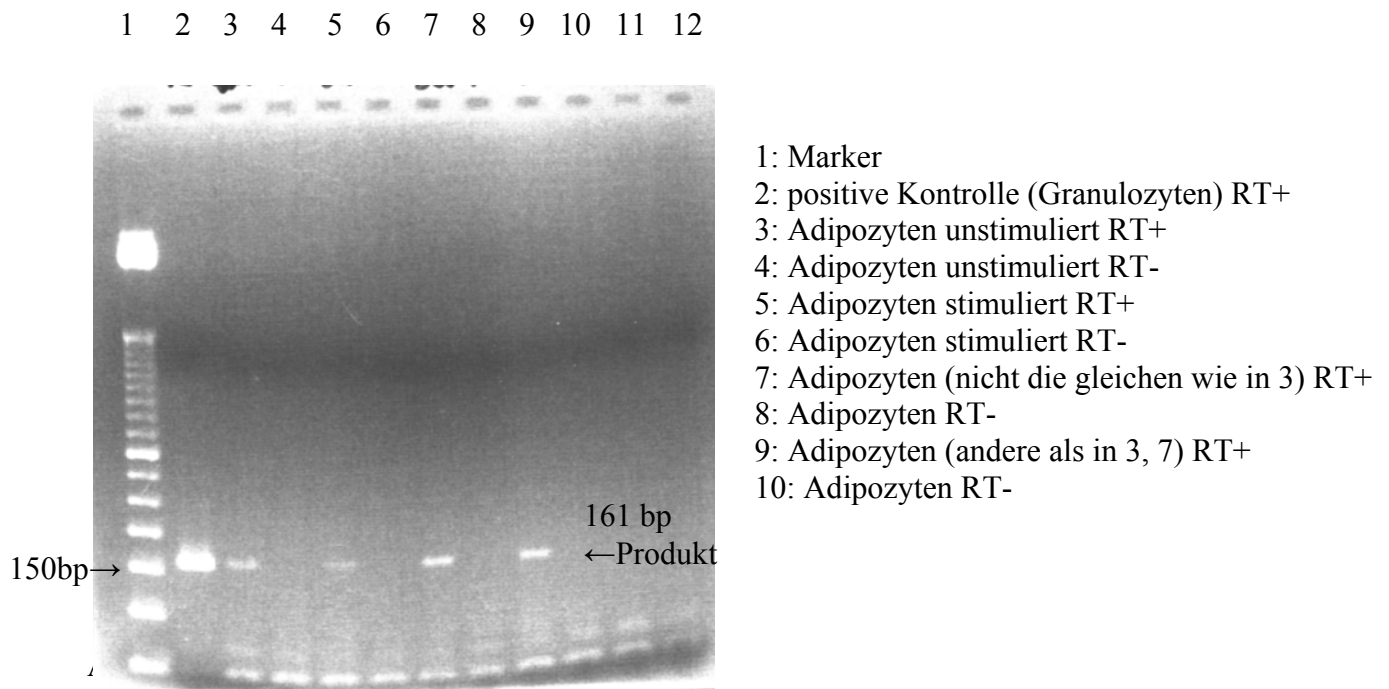


Abbildung 11: PCR für α -Defensin 1. In dieser Abbildung (identisch mit Abb. 10) soll auf den Einsatz von mit Zytokinen stimulierten und unstimulierten Adipozyten hingewiesen werden. Unter qualitativen PCR-Bedingungen zeigte sich kein merklicher Unterschied in der Ausprägung der Banden.

6.2 Quantitative RT-PCR für das α -Defensin 1

Um eine Aussage über eine mögliche Stimulierbarkeit der α -Defensin 1 Expression von Adipozyten treffen zu können, wurde deswegen als nächstes eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Anfänglich wurde die gleiche cDNA aus unstimulierten und mit TNF- α und IFN- γ stimulierten Adipozyten eingesetzt, die auch in der qualitativen RT-PCR eingesetzt wurde. Außerdem wurden verschiedene Konzentrationen der Zytokine und Zellkultur-Inkubations-(Stimulations-)Zeiten ausprobiert (Daten nicht gezeigt). Da dies jedoch zu keinem eindeutigen Schluss führte, folgten Versuche mit LPS (aus *Salmonella minnesota*, Sigma, in RPMI 1640 gelöst, Endkonzentration 1 μ g/ml) und mit hitzeinaktivierten Bakterien einschliesslich *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und zwei *Staphylococcus aureus*-Stämmen.

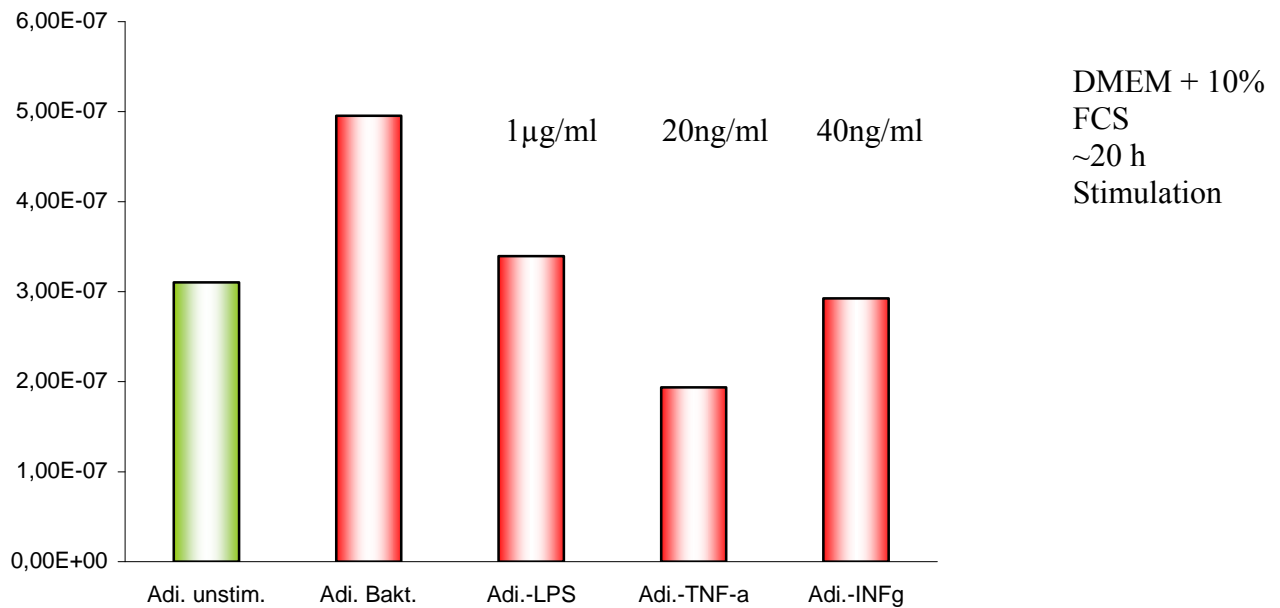


Abbildung 12: TaqMan-PCR für das α -Defensin 1. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant.

6.3 Western Blot für das α -Defensin 1

Gleichzeitig hat uns die Expression der Defensine auf Proteinebene interessiert. Anfangs haben wir uns damit beschäftigt, die Bedingungen für den Western Blot zu etablieren, die bis zu dem Zeitpunkt und mit dem von uns verwendeten Antikörper nicht etabliert waren. Insbesondere ging es unter anderem um die Etablierung des richtigen Lysepuffers (Extraktionspuffer) für Adipozyten (erhebliche Schwierigkeiten, auf Grund des hohen Lipidgehaltes der Zellen). Empirisch fanden wir, dass die Durchführung des Western Blots unter nicht-reduzierten Bedingungen (d.h. ohne Zugabe von β -Mercaptoethanol in die Proben) bessere Ergebnisse liefert, da dann das Protein vom Antikörper besser erkannt wird (Zerstörung von Epitopen der kleinen Defensine durch Mercaptoethanol?). Als positive Kontrolle (Standard) verwendeten wir ein kommerziell erhältliches synthetisches HNP1-Peptid (Firma Bachem, Heidelberg).

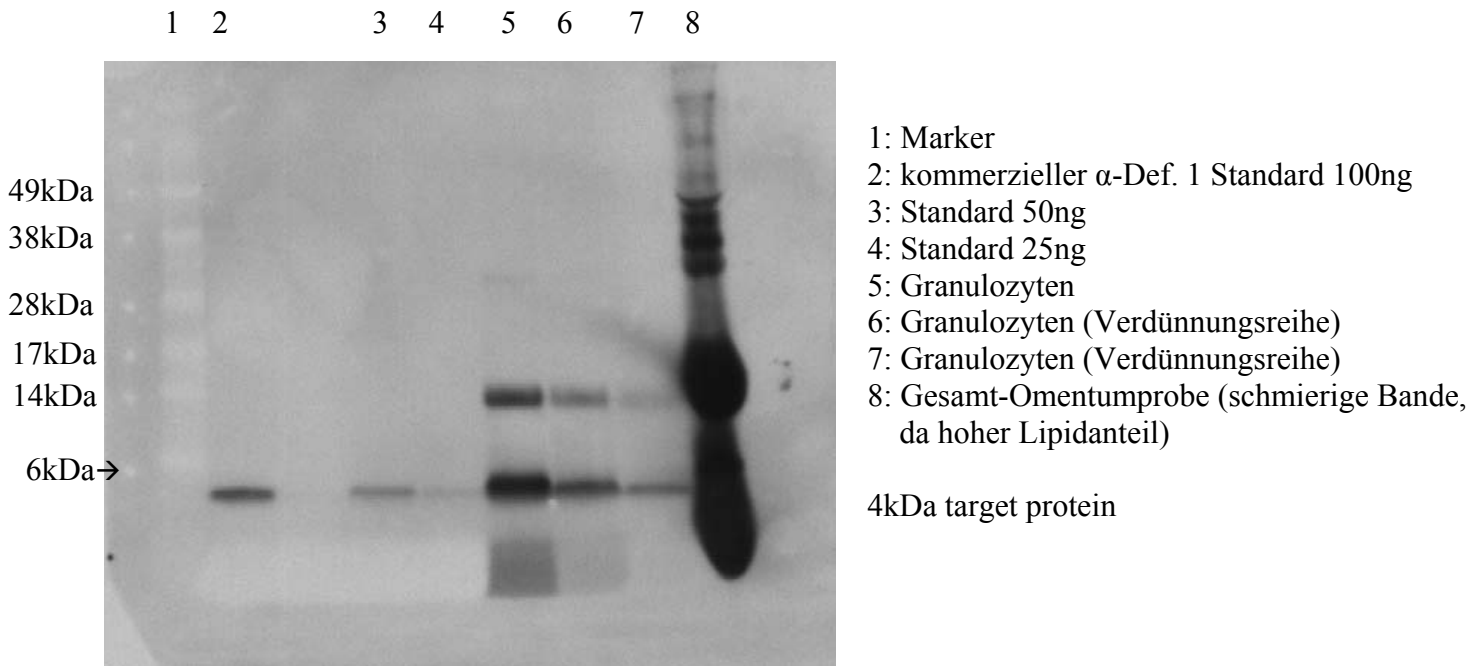


Abbildung 13: Western Blot für α -Defensin 1.

Die Vorgehensweise insgesamt war entsprechend der Prozedur auf RNA-Ebene: erst verwendeten wir Gesamtproteinpräparationen aus Omentum, Nieren, subkutanem Fett, außerdem isolierte Granulozyten zusammen mit einem kommerziell erworbenen Standard als positive Kontrolle.

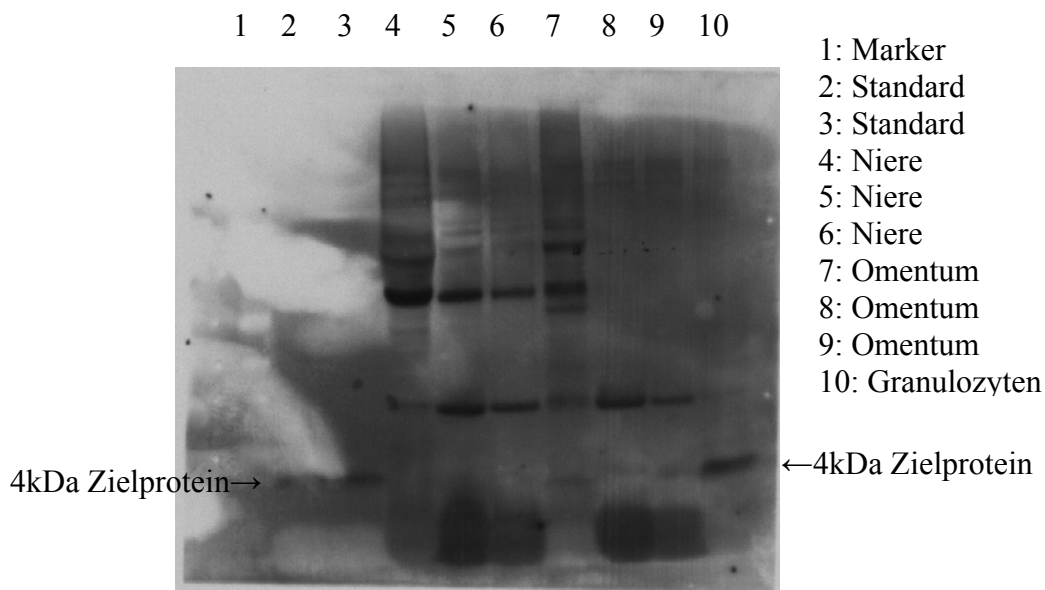


Abbildung 14: Western Blot für α -Defensin 1.

Durchgehend erschienen –so wie in der oben stehenden Abbildung– außer den erwarteten Banden in Höhe von 4 kDa (Zielprotein) auch klar abgrenzbare Banden in Höhe von ca. 16 kDa. Es lag die Vermutung nahe, dass es sich um Tetramere unseres Proteins handeln würde.

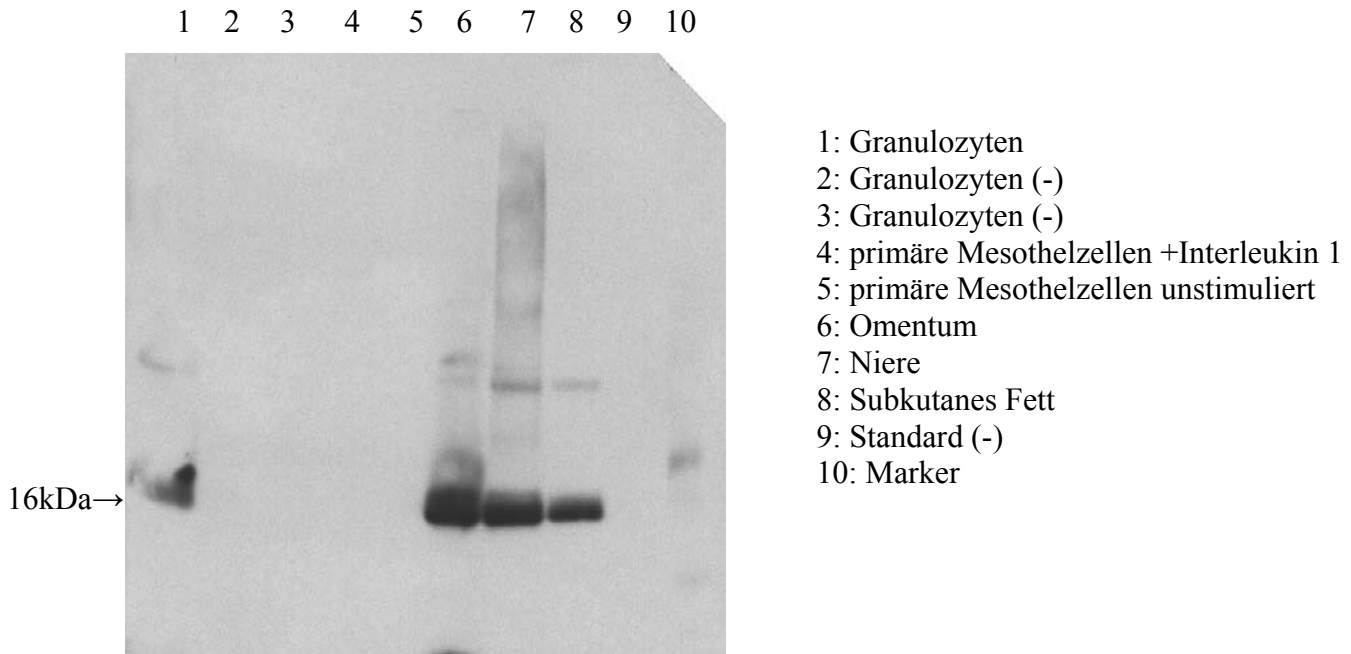


Abbildung 15: Western Blot für α -Defensin 1. Primäre Mesothelzellen negativ.

Nach mehreren Versuchen, die Extraktionsmethode des Defensins und die passenden experimentellen Bedingungen zu etablieren, ergaben sich außer der erwarteten Bande in Höhe von 4kDa durchgehend auch Banden in Höhe von 16kDa, teilweise mit Fehlen der Banden für das Zielprotein (Abbildung 15).

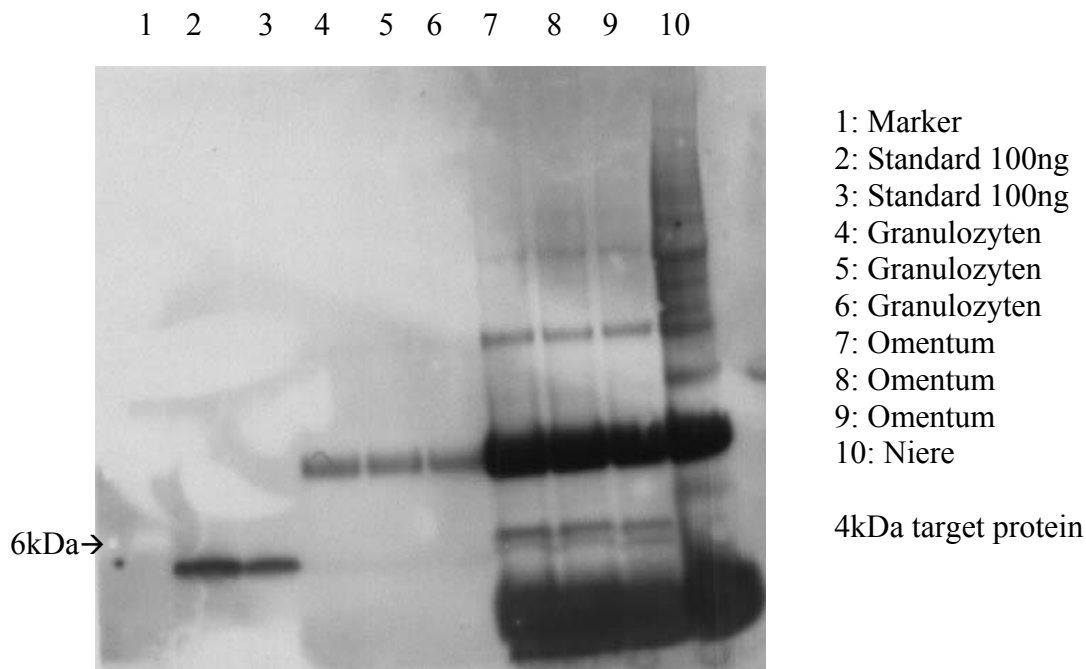


Abbildung 16: Western Blot für α -Defensin 1.

Dies hat die Frage aufgeworfen, ob das α -Defensin 1 nicht eine multimere Form besitzt. Die Höhe 16kDa spräche dabei für eine tetramere Form des Proteins. Es folgten mehrere Versuche, mittels verschiedener Strategien, die vermuteten „Tetramere“ zu sprengen, z.B. mittels Inkubationen und Fällungen mit hochprozentiger Urea, Erhitzungszyklen usw. jedoch ohne Erfolg (Daten nicht gezeigt). Zur exakteren Beschreibung haben wir entsprechend der Sequenzierung der PCR-Produkte auch eine Proteinsequenzierung dieser vermuteten Tetramere durchgeführt. Die Bande in Höhe von 16 kDa hat sich dabei als Hämoglobinkette erwiesen.

Es folgten mehrere Western Blots mit dem Einsatz von Protein aus „reinen“ isolierten Adipozyten. Es konnte dabei kein positives Ergebnis für Adipozyten und das α -Defensin 1 gezeigt werden, sowohl für unstimulierte, als auch für stimulierte Zellen.

6.4 Immunhistochemie für das α -Defensin 1

Die Immunhistochemie sollte einen weiteren zusätzlichen Beweis der Defensinexpression zu unseren schon bestehenden Daten hinzufügen. Untenstehend zeigt Abbildung 17a) das Ergebnis der Immunhistochemie an Omentumschnitten mit dem HNP1 monoklonalen Antikörper. Die Fettvakuolen wurden aufgrund der Fixierung mit Aceton aus den Adipozyten herausgelöst. Man erkennt eine deutliche Anfärbung des schmalen Zytoplasmas der Zellen. Auch die das Gewebe infiltrierende Leukozyten, wie vergrößert in Abbildung 17b) zu sehen, sind stark positiv für das HNP1, jedoch ist ihre Anfärbung deutlich unabhängig von der Adipozytenreaktion. Die Abbildung 17c) stellt die Negativkontrolle dar, bei der der Primärantikörper bei der Inkubation weggelassen wurde. Abbildung 17d) schliesslich zeigt das Verschwinden des positiven Signals für das HNP1 in Adipozyten und Leukozyten nach Absorption des Antikörpers mit dem synthetischen HNP1 Antigen.

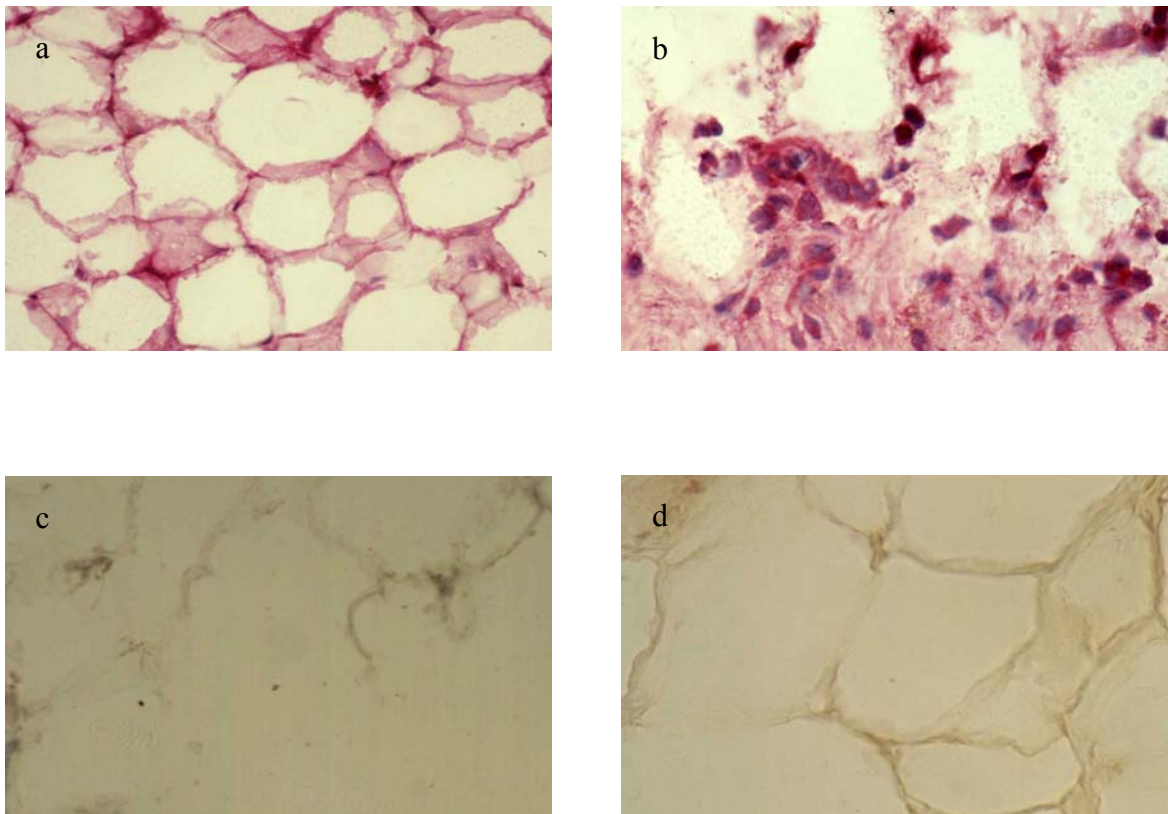


Abbildung 17: Immunhistochemie für das α -Defensin 1. Deutliches positives Signal des Adipozytenzytoskelets.

6.5 RT-PCR für das α -Defensin 5

In Bezug auf das α -Defensin 5 erwiesen sich die Untersuchungen mit der RT-PCR sehr komplex. Die Vorgehensweise in der Planung der Experimente war dieselbe wie für das α -Defensin 1 (Proben aus Gesamtgewebe, isolierten Zellen, Stimulation mit Zytokinen). Die ersten Experimente beinhalteten cDNA aus Gesamtpräparationen von Duodenum (positive Kontrolle für das α -Defensin 5), Niere, subkutanem Fett und Omentum.

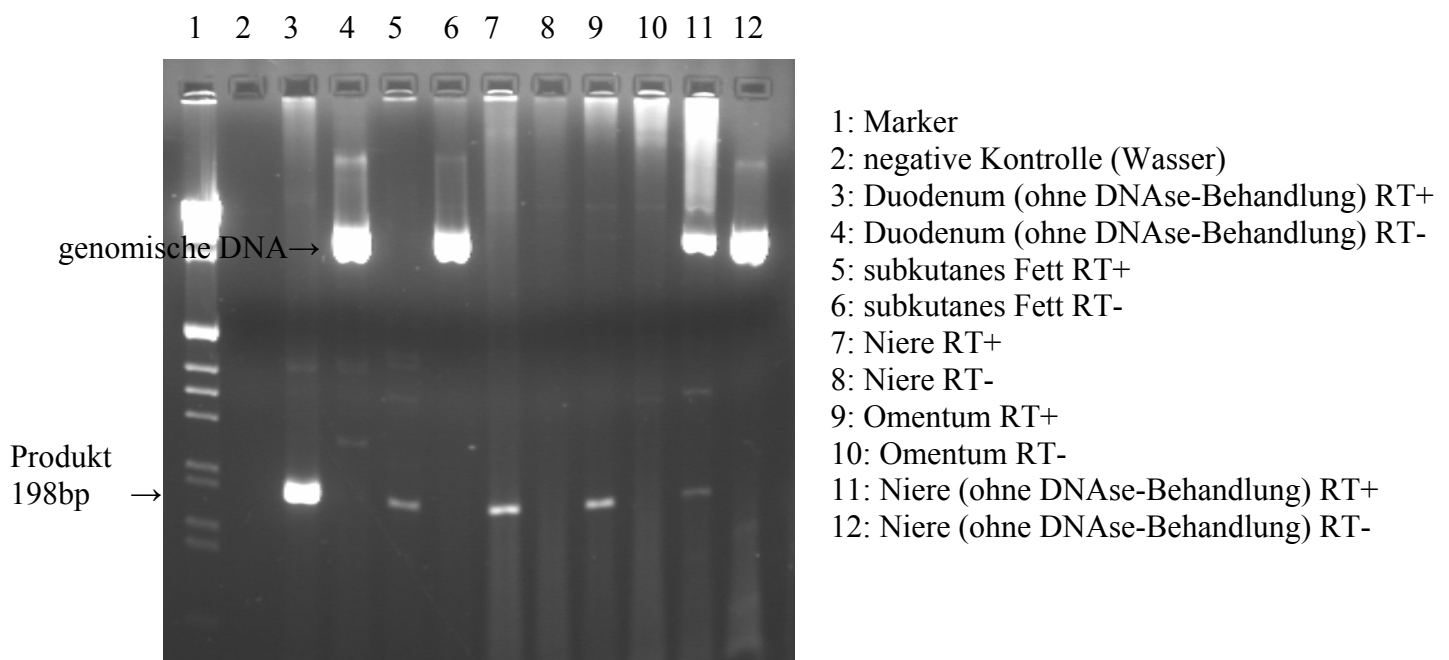


Abbildung 18: PCR für α -Defensin 5.

Entsprechend dem Vorgehen für das α -Defensin 1 behandelten wir die Proben mit DNase, um Kontaminationen mit genomischer DNA zu vermeiden. Im weiteren erfolgten Versuche mit Duodenum, Gesamt-Omentumpräparationen und mit isolierten Mesothelzellen, die wir mit Isoleucin stimuliert hatten oder unstimuliert ließen.

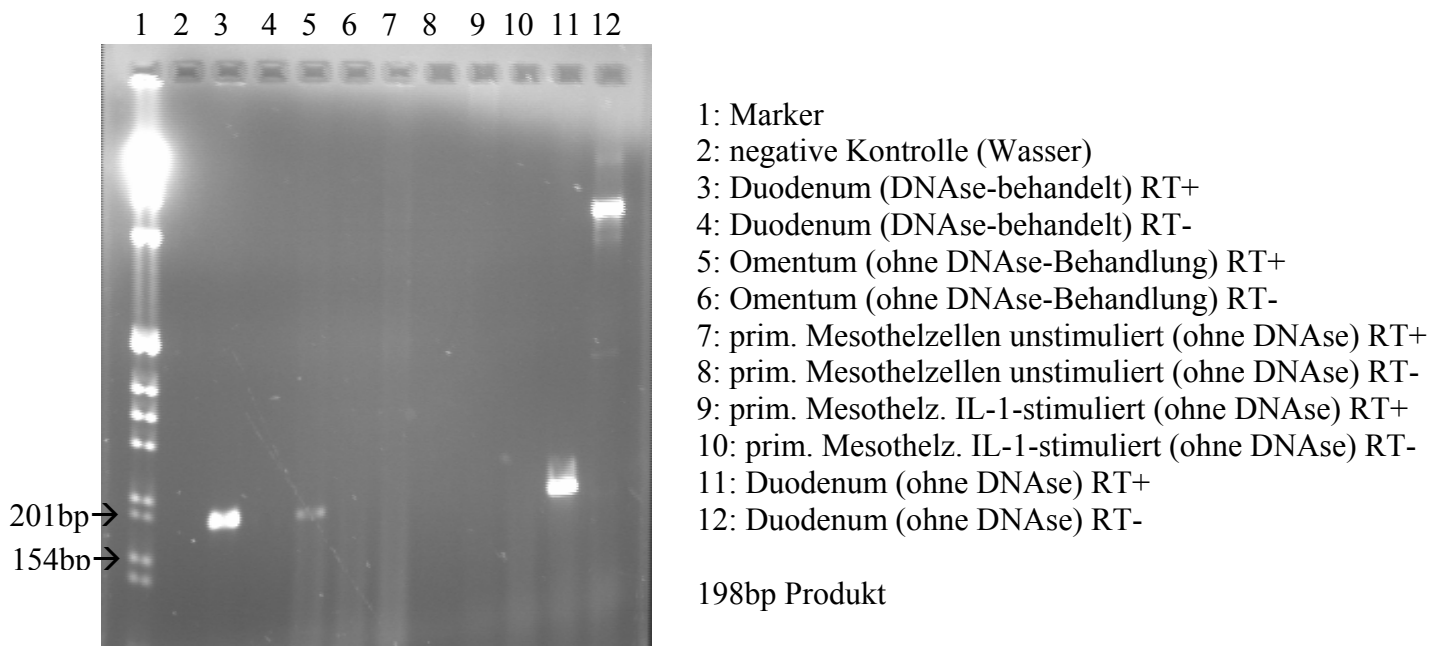


Abbildung 19: PCR für α -Defensin 5.

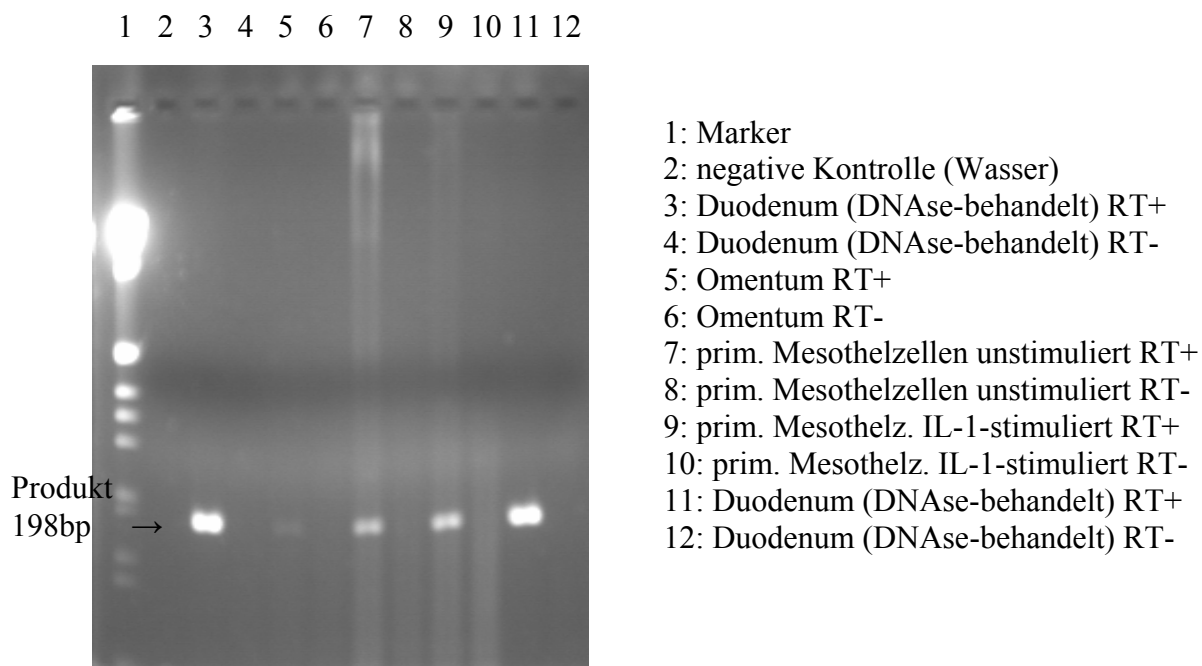


Abbildung 20: PCR für α -Defensin 5. Im Gegensatz zur Abb. 19 zeigten sich bei Einsatz höherer cDNA Mengen positive Banden für primäre Mesothelzellen. Die Ergebnisse für Mesothelzellen zeigten sich inkonsistent. Zu jenem Zeitpunkt waren die Adipozyten Schwerpunkt unserer Untersuchungen.

Adipozyten, die wir nach der von Rodbell beschriebenen Methode isoliert haben, zeigten ebenso positive Banden für das α -Defensin 5.

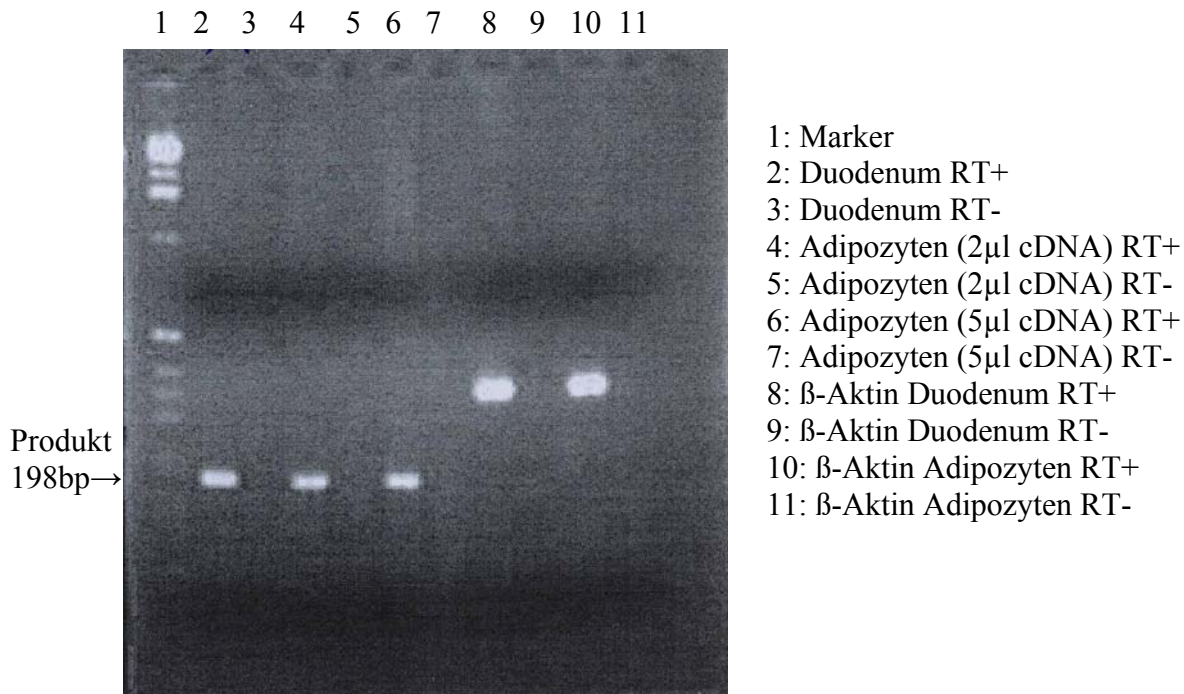


Abbildung 21: PCR für α -Defensin 5.

Daraufhin stimulierten wir die Adipozyten mit Zytokinen. So ergaben Adipozyten -und zwar sowohl unstimulierte als auch mit TNF- α (20ng/ml) + IFN- γ (40 ng/ml) stimulierte- mit spezifischen Primern positive Banden für das α -Defensin 5, genauso wie die positive Kontrolle Duodenum.

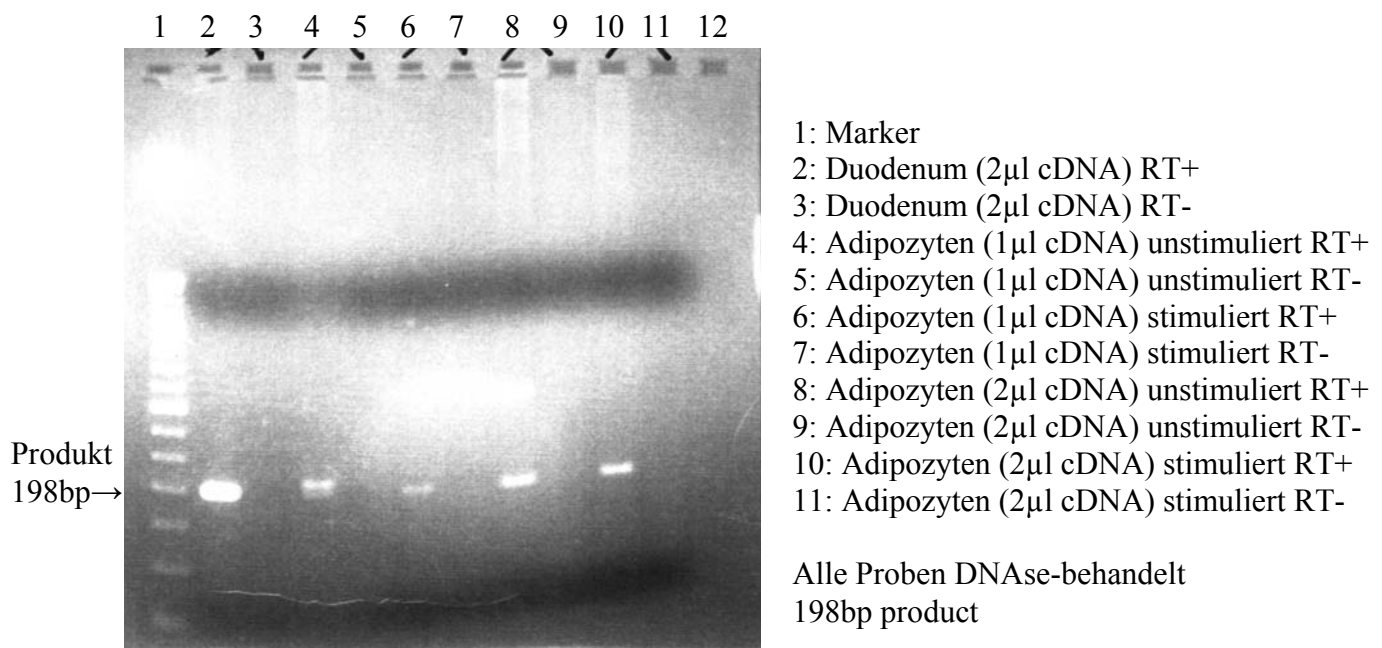


Abbildung 22: PCR für α -Defensin 5.

Ein nächstes Experiment hatte zum Ziel, die Expression des α -Defensin 5 Gens in Adipozyten zu induzieren. Deswegen wurden Adipozyten -ähnlich wie bei α -Defensin 1- mit verschiedenen Agenzien (Zytokinen und Bakterien) stimuliert und mittels TaqMan PCR auf α -Defensin 5 Expression analysiert. Allerdings zeigte sich dabei keine Expression des Defensins (Daten nicht gezeigt).

Aus diesem Grund wiederholten wir die qualitative RT-PCR unter Verwendung eines zweiten Primer-Paares mit genau denselben Proben, die in der RT-PCR der Abbildung 22 positiv waren. Mit diesem zweiten Primer-Paar zeigte sich das Duodenum positiv für das α -Defensin 5, während unsere Adipozyten-Präparationen erstaunlicherweise keine Banden aufwiesen.

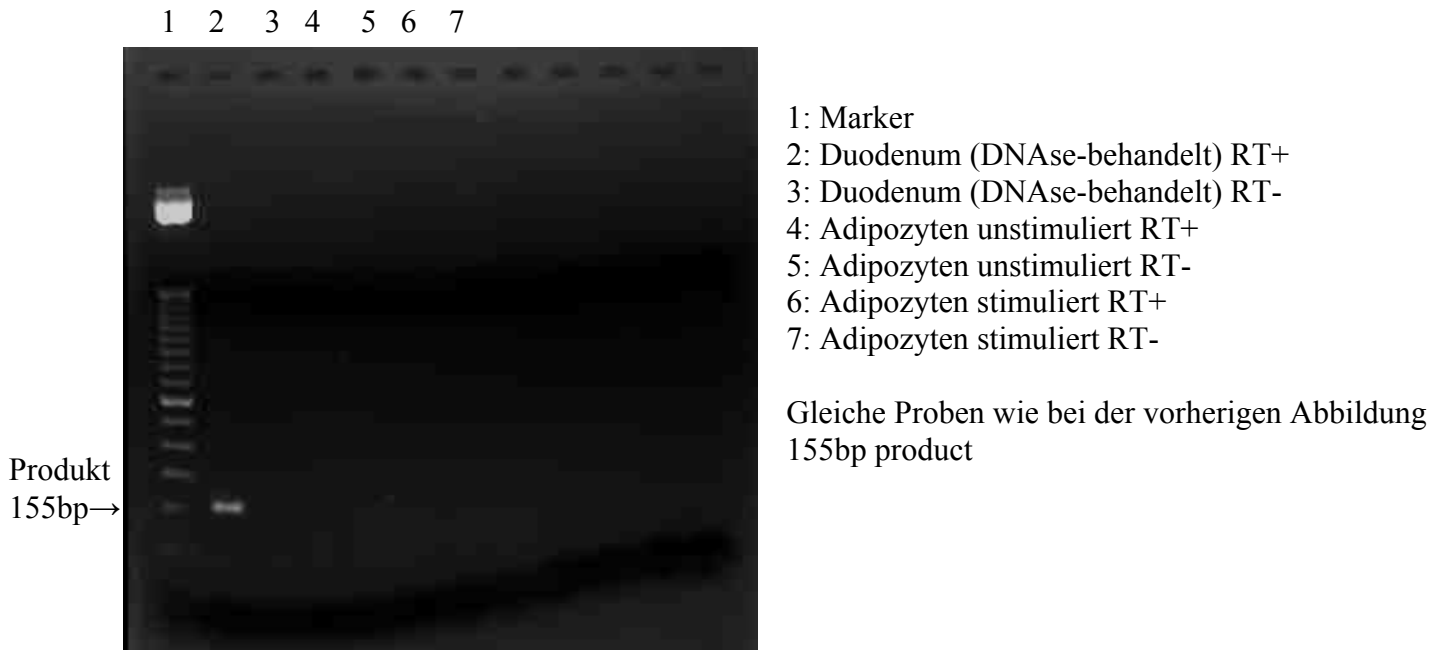


Abbildung 23: PCR für α -Defensin 5.

6.6 Northern-Blot für das α -Defensin 5

Nachdem mit zwei unterschiedlichen Primer-Paaren gegensätzliche Ergebnisse zustande kamen (einmal positiv und einmal negativ), bestand die Überlegung, bei der Adipozyten-RNA für das α -Defensin 5 könnte es sich um eine Splice-Variante handeln, welche von dem einen Primer-Paar nicht erkannt werden kann. Zur Überprüfung dieser Tatsache wurde ein einmaliger Northern-Blot durchgeführt (siehe Material und Methoden). Hierbei zeigte sich jedoch weder für unstimulierte noch stimulierte Adipozyten ein positives Signal für α -Defensin 5.



- 1: Duodenum
- 2: unstimulierte Adipozyten
- 3: stimulierte Adipozyten

Abbildung 25: Northern-Blot für α -Defensin 5.

6.7 Western Blot für das α -Defensin 5

Dabei unternahmen wir mehrere Versuche, die Methode zu etablieren. Repräsentativ für unsere Versuche, den Western-Blot für das α -Defensin 5 zu etablieren, ist folgendes Ergebnis:

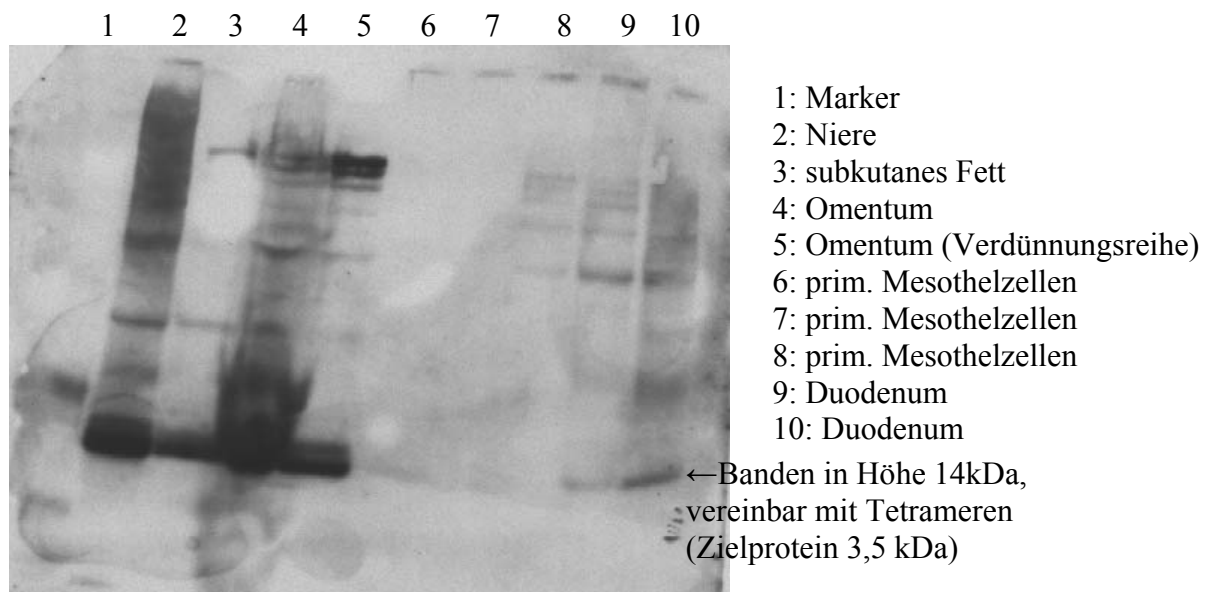


Abbildung 26: Western Blot für α -Defensin 5.

Der Western Blot für das α -Defensin 5 in Adipozyten stellte sich als negativ dar, allerdings ergaben unsere Untersuchungen auch bei der positiven Kontrolle (Duodenum) ein nur sehr schwaches Signal.

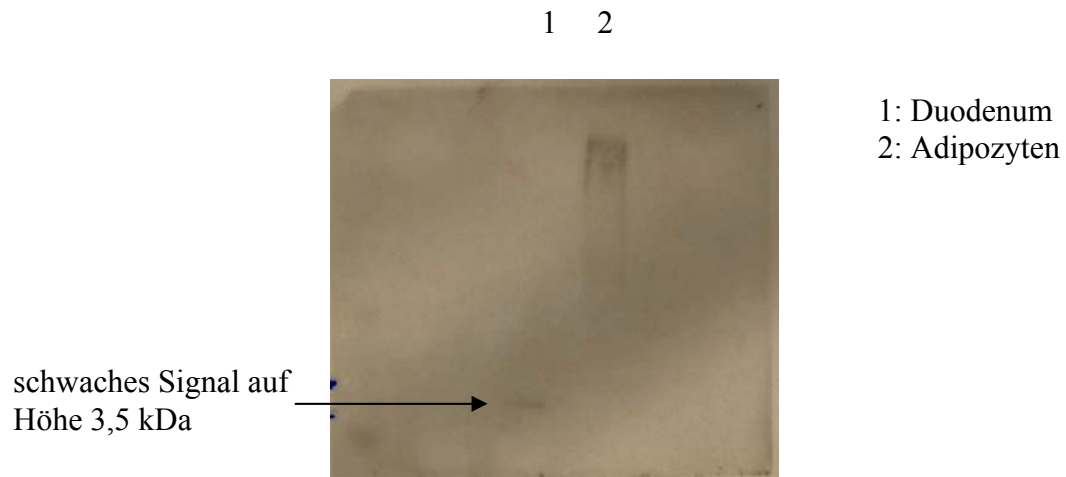


Abbildung 27: Western Blot für das α -Defensin 5

6.8 Immunhistochemie für das α -Defensin 5

Der von uns im Western Blot eingesetzte Antikörper gegen α -Defensin 5 hat sich für die Immunhistochemie als nicht geeignet erwiesen (kein Signal). Nach Rücksprache mit der herstellenden Firma, bestätigte uns diese, den Antikörper bei immunhistochemischen Untersuchungen nicht geprüft zu haben.

7. Diskussion

7.1 Neueste Erkenntnisse über die Rolle des Fettgewebes in der angeborenen Immunabwehr des Menschen

Eine ganze Reihe von neueren Erkenntnissen deuten auf den Beitrag von adipösem Gewebe in der angeborenen Immunabwehr hin. So stimuliert LPS die Produktion von TNF- α in humanen Adipozyten (Sewter et al, 1999), dies könnte außer denkbaren Effekten auf Differenzierung, Apoptose und Lipidmetabolismus- auch eine Rolle von adipozytärem TNF- α in der Wirtsabwehr implizieren. Außerdem sind Adipozyten eine bedeutende Quelle verschiedener Komponenten des Komplementsystems einschließlich Faktor D (Adipsin), B und C3 (Peake et al. 1997). Levine et al. haben kürzlich gezeigt, dass Adipozyten auch MC-SF (macrophage colony-stimulating factor) produzieren, welcher einen proliferativen Stimulus für Makrophagen darstellt, der in Fettgewebe hochreguliert werden kann. Letzteres hat man beispielsweise im Fettgewebe, welches entzündliche intestinale Läsionen bei M. Crohn umgibt, beobachtet (sog. „creeping fat“). Fettgewebe produziert ebenfalls Interleukin-6 (Fried et al. 1998), ein Zytokin, welches eine systemische Rolle bei Infektionen und entzündlichen Erkrankungen als Teil der Akute-Phase-Reaktion spielt. Schließlich zeigt Leptin, ein Haupt-Sekretionsprodukt von Adipozyten wichtige Effekte auf die Funktion von Lymphozyten (Lord et al. 1998). Gainsford et al. (1996) fanden heraus, dass die Zugabe von Leptin in Kulturmedium die Zytokinproduktion und Phagozytose von Leishmanien durch peritoneale Makrophagen der Maus verstärkte. Schließlich ist seit mehr als 30 Jahren bekannt, dass das Omentum majus eine wichtige Rolle in der Wirtsabwehr spielt, da es einen Ort der Antikörpersynthese darstellt (Walker et al, 1961).

7.2 Humane peritoneale Adipozyten synthetisieren antimikrobiell wirksame Peptide (α -Defensine)

Defensine haben erst seit wenigen Jahren auf Grund ihrer Eigenschaften das Forschungsinteresse geweckt. Verschiedene experimentelle Modelle geben Hinweise dafür, dass Defensine und andere antimikrobielle Peptide hauptsächlich als natürlich vorkommende Antibiotika in entzündetem Gewebe fungieren. Neben ihrer Bedeutung als Antibiotika wurden insbesondere auch andere Funktionen der Moleküle, wie die des Entzündungsmediators,

erkannt. Bereits mehrere Gewebe aus verschiedenen Organen wurden auf das Vorhandensein von Defensinen hin untersucht, von der Haut über die Lunge bis zur Gebärmutter. Allerdings hat sich bislang niemand mit der Frage des Nachweises von Defensinen in Fettgewebe und isolierten Fettzellen beschäftigt.

In der vorliegenden Arbeit wurden wir mit mehreren Schwierigkeiten konfrontiert. Die Beschaffung von Gewebe war schwierig: wir haben 1 Gewebeprobe alle 9 Wochen erhalten. Diese Tatsache machte die Planung der Experimente schwierig. Adipozyten liefern zudem eine geringe Ausbeute an RNA und Protein, da sie während ihrer Isolierungsprozedur leicht zerstört werden und die Lipide dabei freigesetzt werden. Die Lipide wiederum interferieren mit der Extraktion von DNS, RNS und der von Proteinen. Dies erforderte die Optimierung von Methoden und machte Wiederholungen von Experimenten notwendig. Die Methodik für die Untersuchung der Fragestellung musste dabei von Grund neu aufgebaut werden. So wurden z.B. die Bedingungen des Western-Blots für α -Defensin 1 in Granulozyten in dieser Arbeit erstmalig etabliert.

Trotz allem konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass hochgereinigte Adipozyten aus dem Omentum majus α -Defensin 1 exprimieren. Dies haben wir sowohl auf RNA- (RT-PCR, quantitative TaqMan-PCR), als auch auf Protein-Ebene (Western-Blot, Immunhistochemie) untersucht. Um festzustellen, ob α -Defensin Expression auch in Fettzellen anderer Gewebe stattfindet, haben wir subkutanen Fett mit den gleichen Methoden analysiert und bestätigten die Fettzelle als Ort der α -Defensin 1 Synthese. Es ist uns somit der Nachweis für α -Defensin 1 in Adipozyten gelungen.

Es ist bei den von uns verwendeten Adipozyten von hochgereinigten Adipozyten auszugehen. Der zweite Filtrationsschritt unserer Fettzellsuspension durch den 30 μ m Filter (siehe „Isolierung von Adipozyten“ im Abschnitt Material und Methoden) beseitigte kontaminierende Endothelzellen. Die nach der Methode von Rodbell gewonnenen Adipozyten wurden 3 Mal mit PBS gewaschen und es wurden -im Gegensatz zu vielen anderen wissenschaftlichen Untersuchungen mit Adipozyten- 3 Zentrifugationsschritte eingeschaltet, die in der Adipozytensuspension noch erhaltene weitere Zelltypen pelletieren und Adipozyten an der Oberfläche flottieren ließen. Auf der anderen Seite lieferte diese gewählte Vorgehensweise stets geringe Ausbeuten an intakten Zellen. Weiterhin haben wir in unseren Stimulationsexperimenten die Zellsuspensionen in Kulturflaschen ausgesät, so dass alle

weiteren Zelltypen am Flaschenboden anwachsen und die flottierenden Adipozyten in „reiner“ Form abgenommen werden konnten. Aus diesem Grund verzichteten wir auf immunhistochemische Färbungen mit Endothelzell-, Fibroblasten- und Monocyten-/Makrophagenmarkern. Eine weitere Aufreinigung insbesondere von Präadipozyten wäre durch FACS möglich. Leider gibt es dazu keinen spezifischen Präadipozyten-Marker.

Schwierigkeiten im Nachweis der Defensine im Western Blot sind vermutlich methodischer Genese, da die Sensitivität des Antikörpers im Western Blot niedrig ist. Auf Grund dessen erfolgte der Versuch der Konzentrierung der Proben. Der Versuch, Protein aus Adipozyten zu konzentrieren erwies sich als problematisch: Nicht nur nach der Trichloressigsäure(TCA)-Methode, sondern auch nach der Aceton-Fällung erwies es sich als teilweise unmöglich, die Proteine nach Denaturierung wieder in Lösung zu bringen. Konzentrieren in Centricon-Gefäßen (z.B. Firma Amicon) kam für uns auf Grund des sehr kleinen gesuchten Molekulargewichts nicht in Frage.

Die Proteinkonzentrierung mittels Acetonfällung hat meistens Proteinmengen zwischen 0,5-1µg/µl ergeben. Maximal aufzutragende Mengen an Protein auf ein Western Blot-Gel waren demnach ca. 20µg. Der Einsatz dieser Menge an Gesamtprotein ergab auch bei der positiven Kontrolle keine Banden. Mit Trichloressigsäure gefällte Proben ergaben -trotz angeblichen Einsatzes von bis zu 60µg- kein Signal. Die Western Blot Membranen wurden deshalb nach dem Transfer mit Ponceau-Rot gefärbt. Bei dieser Färbung waren keine Banden auf der Membran zu sehen. Es ist nicht davon auszugehen, dass der Transfer auf die Membran gescheitert war, da die Bedingungen des Western Blots bereits in früheren Versuchen gut etabliert wurden. Wahrscheinlicher erscheint es, dass wir nicht genug Protein aus Adipozyten erhielten, um dies im Western Blot einzusetzen und dass die Proteinkonzentrationsbestimmung mit gefällten und wieder in Lösung gebrachten Proben keine zuverlässigen Ergebnisse lieferte.

Theoretisch könnte es auch sein, dass sich unser gesuchtes Protein in der Lipidphase befindet, die nach der Zelllyse entfernt wurde. Dies würde eine Extraktion notwendig machen. Der Versuch, das Lämml-Lysat der Positivkontrolle (Granulozyten) mit der Adipozyten-Lipidphase zu vermengen, um festzustellen, ob sich das Protein in der Lipidphase maskiert, schlug dadurch fehl, dass die Banden im Western Blot auf Grund des hohen Lipidanteils deformiert und nicht verwertbar waren. Eine Möglichkeit dies aufzuklären war eine Literaturrecherche bezüglich der Isolierung eines lipophilen Proteins aus Adipozyten. Diese

lieferte jedoch keine Ergebnisse. Generell sollte sich ein intaktes Protein nicht in Lipidtropfen integrieren, sondern höchstens in deren Phospholipidmembranen.

Insofern entstand zunächst ein scheinbarer Widerspruch: Adipozyten waren positiv für das α -Defensin 1 auf RNA Ebene (positive PCR), zeigten sich aber negativ auf Proteinebene (negativer Western Blot). Wir haben uns daraufhin entschieden, eine 2. Methode zur Überprüfung der Hypothese auf Proteinebene zu verwenden: die Immunhistochemie. Dies ergab ein sehr deutliches Ergebnis für das α -Defensin 1 in Adipozyten.

Für das α -Defensin 5 gehen wir beim Western Blot von einem Antikörperproblem aus. Nach Rücksprache mit der herstellenden Firma haben wir erfahren, dass der Antikörper für Western Blots nicht getestet worden war. Das von der Firma verkäufliche synthetische α -Defensin 5 Peptid wird ohne Signalmolekül hergestellt und ist für unsere Western Blot Gele als positive Kontrolle und im Vergleich zum biologischen Peptid zu klein gewesen. Ein alternativer Antikörper stand nicht zur Verfügung.

Die ursprüngliche Annahme, dass es sich bei den 14kDa großen Banden im Western Blot für das α -Defensin 1 um multimere Formen des Defensins handeln könnte, wurde durch Proteinsequenzierung nicht bestätigt. Das Ergebnis der Sequenzierung lieferte Hämoglobin B. Eine Kreuzreaktion des Antikörpers war der liefernden Firma nicht bekannt. Insofern waren unsere Western Blots auch Qualitätskontrolle für den gelieferten Antikörper. Es ist bekannt, dass viele Antikörper, die nicht gut charakterisiert sind (z.B. affinitätsgereinigt) kreuzreagieren können, sowohl als 1. oder auch als 2. Antikörper. In der starken Hauptbande kann natürlich theoretisch auch eine geringe Menge an Defensin vorhanden sein, welches für die Immunreaktion (mit-)verantwortlich ist. Ca. 1-5% Hintergrund an Defensinen würden im Hämoglobingemisch auffallen (persönliche Mitteilung von Dr. Hans Heid, Krebsforschungszentrum Heidelberg). Hier wäre eine 2-dimensionale Gelauf trennung hilfreich, in der die Hämoglobine besser von den Defensinen getrennt und separat sequenziert werden könnten.

Bezüglich der PCR und der mit dem alternativen Primer-Paar nicht nachweisbaren positiven Banden für das α -Defensin 5 in Adipozyten ist eine mögliche Erklärung das Vorhandensein einer Splice-Variante für das α -Defensin 5 in Adipozyten.

7.3 Mögliche Implikationen des Vorhandenseins von Defensinen im Omentum majus

Die zentrale Rolle des angeborenen Immunsystems, insbesondere der antimikrobiellen Peptide wie den Defensinen, wurde lange Zeit zugunsten der adaptiven Immunität vernachlässigt. Molekularbiologische, zellbiologische und klinische Untersuchungen belegen auch eine klinische Bedeutung dieses Systems. Dies gilt sowohl für die Dermatologie als auch für entzündliche Darm-, Lungen- und Nierenerkrankungen. Künftige Untersuchungen müssen ergründen, ob diese Peptide zur Infektionsprophylaxe oder Therapie eingesetzt werden können und ob vielleicht auch die artifizielle Induktion einer endogenen Produktion dieser Peptidantibiotika als Infektionsschutz geeignet ist.

Das ubiquitäre Vorkommen von Fettzellen, vor allem in der peritonealen Höhle und in der Subkutis, macht diese Gewebe zu einem Pool antimikrobieller Peptide wie α -Defensine und somit zu einem Teil der innate immunity. Die Freisetzung von konstitutiv synthetisierten und in Fettzellen gespeicherten Defensinen könnte womöglich bakteriellen Entzündungen nach Gewebsverletzung aufgrund lokaler mikrobizider Effekte vorbeugen. Außer ihrer direkten mikrobiziden Wirkung besitzen Defensine aber auch chemotaktische Eigenschaften (siehe Einleitung) und stellen so ein Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunabwehr dar.

Im Falle der Peritonealdialyse könnte die Defensinproduktion durch Adipozyten des Omentums die Peritonealhöhle vor Infektionen schützen. Eine solche Annahme wird z.B. durch die Tatsache unterstützt, dass bakterielle Peritonitiden im Rahmen der ambulanten Peritonealdialyse (CAPD) -trotz permanenter Entzündungsstimuli aufgrund der Exposition mit der Spüllösung und dem Spülkatheter- mit 1,1% pro Patient pro Jahr eine seltene Komplikation darstellen (Vargemezis et al, 2001). Darüberhinaus sind spontane Peritonitiden selbst in Fällen schwerer intestinaler Mukositis mit Verlust der normalen intestinalen epithelialen Barriere extrem selten. Interessant ist auch die Tatsache, dass Omentum in der Abdominalchirurgie empirisch dafür verwendet wird, um an Stellen intestinaler Perforation die Anastomosenfläche „abzudichten“ und fatalen Peritonitiden vorzubeugen (Allgöwer et al in „Chirurgische Gastroenterologie“, Springer Berlin-Heidelberg-New York 1981, S.: 1076-1078; Dziri et al, 1999). Die Fettzellen des Omentums könnten demnach einen wichtigen Faktor im Schutz gegenüber der CAPD-assoziierten Peritonitis darstellen. In diesem

Zusammenhang könnte man weiterhin die potenziellen Interaktionen von Dialyse-Lösungen mit der Freisetzung und Aktivität von Defensinen des Omentum untersuchen.

7.4 Ausblick: Die Rolle von antimikrobiellen Peptiden im Zeitalter der Antibiotika-Resistenzen, Verwendung als Pharmaka

Im Rahmen von Dialysebehandlungen bereits eingetretene bakterielle Peritonitiden stellen andererseits schwerwiegende Krankheitszustände dar. Sie initiieren eine inflammatorische Kaskade, die eine Fibrose der Peritonealmembran mit Filtrationsversagen nach sich zieht. Die rasche und adäquate Therapie der dialyseassoziierten Peritonitis ist entscheidend, um kurz- und langfristige Komplikationen am Peritoneum zu vermeiden. Vor allem Infektionen mit *Staph. aureus* sind ernsthafte Komplikationen der chronischen Peritonealdialyse.

Die schnelle Vermehrung von Bakterien und ihre genetische Variabilität erlauben Mikroorganismen, in kurzer Zeit gegen Antibiotika resistent zu werden. Ein Problem dabei ist, dass in den letzten Jahrzehnten keine neuen Klassen von Antibiotika entwickelt wurden. So sind beispielsweise neue Dritt- und Viertgenerationscephalosporine, Imipenem und neue Fluorochinolone nur Abkömmlinge älterer Grundsubstanzen. Es ist demnach notwendig, vorhandene Optionen der Vorbeugung und Therapie der dialyse-assoziierten Peritonitis zu verbessern und neue Methoden zu entwickeln.

Eine Resistenzentwicklung von Mikroorganismen gegen antimikrobielle Peptide ist mit Ausnahme einiger weniger Bakterienspezies trotz der langen Zeitspanne möglicher evolutionärer Entwicklungen nicht eingetreten. Gründe für die fehlende Resistenzentwicklung sind die enorme Vielfalt der antimikrobiellen Peptide und das Fehlen von Epitopen, die als Angriffspunkt für bakterielle Proteasen dienen könnten. Darüber hinaus ist die Umstrukturierung der bakteriellen Zellmembran als Angriffspunkt antimikrobieller Peptide aus evolutionsbiologischer Sicht nur schwer umsetzbar (Zasloff, 2002).

Antimikrobielle Peptide könnten als Ausgangsmoleküle für die Einführung innovativer Antibiotika des Menschen verwendet werden. Ob sich Peptidantibiotika für klinische Anwendungen eignen, wird von vielen Faktoren abhängen, darunter Toxizität, Stabilität und Immunogenität der Substanzen (Latham, 1999). Es werden aktuell klinische Studien für topische Anwendungen durchgeführt. Einige Substanzen werden auch für inhalative oder

gastrointestinale Applikationsrouten entwickelt. Defensine könnten beispielsweise therapeutisch als Komponenten der peritonealen Dialyseflüssigkeit oder zum Beschichten von Kathetern zur Vorbeugung bakterieller Peritonitiden -und des darausfolgenden Filtrationsversagens- eingesetzt werden. Diese topischen Anwendungen erlauben allerdings keinen Schluss auf die Verwendbarkeit antimikrobieller Peptide für den Einsatz als systemische Antibiotika. Aufgrund ihres Wirkungsspektrums ist die Verwendung antimikrobieller Peptide nicht nur als Antibiotika, sondern auch als Immunmodulatoren sowie anti-LPS-Pharmaka denkbar.

In Zukunft werden aus verschiedenen Bereichen Erkenntnisgewinne zu erwarten sein. Zum einen werden durch die Ergebnisse des Human Genome Project und die Möglichkeiten der Bioinformatik neue Moleküle entdeckt werden. Zum anderen werden Funktionen antimikrobieller Peptide durch die Anwendungen verschiedener Techniken analysiert werden. Interessant wäre zu untersuchen, wie die Variationen in der Aminosäuresequenz der Defensine ihre Spezifität gegenüber einer Reihe von Mikroorganismen beeinflussen und andererseits, wie strukturelle Änderungen in Mikroorganismen ihre Sensitivität gegenüber speziellen Defensinen modulieren. Untersuchungen des Einflusses von Defensin-Genpolymorphismen auf die Inzidenz einzelner Erkrankungen stehen noch aus. Murine Homologe antimikrobieller Peptide des Menschen eröffnen wichtige Möglichkeiten, genetische Strategien in transgenen und/oder knockout-Mausmodellen anzuwenden (Bals et al, 1998; Bals et al, 1998; Morrison et al, 1999; Morrison et al, 1998).

8. Zusammenfassung

Wir haben in der vorliegenden Arbeit das Vorhandensein von Defensinen, einer Gruppe natürlich vorkommender antimikrobieller Peptide, in der Peritonealhöhle untersucht. Unser Augenmerk richteten wir dabei auf die Adipozyten des Omentum majus, da eine mögliche Expression von Defensinen in Fettzellen auf Grund deren ubiquitären Verteilung im menschlichen Körper wichtige Erkenntnisse und Implikationen für zukünftige klinische Anwendungen haben würde (siehe auch „Ziel der Studie“ im Abschnitt „Einleitung“).

Wir benutzten Nachweismethoden auf RNA- (RT-PCR, quantitative TaqMan-PCR, Northern Blot) und Protein-Ebene (Western-Blot, Immunhistochemie). Tatsächlich ist es uns gelungen, das humane α -Defensin 1 in hochgereinigten Adipozyten des Omentum majus und des subkutanen Fettgewebes in der PCR und in der Immunhistochemie nachzuweisen. Die Durchführung des Western Blots erwies sich als komplex (siehe „Diskussion“). Daher kann gesagt werden, dass humane peritoneale Adipozyten wahrscheinlich das humane α -Defensin 1 synthetisieren. Zur Expression von humanem α -Defensin 5 können wir aktuell keine abschliessende Aussage treffen. Einerseits gelang dessen Nachweis in der PCR; Western Blot und Immunhistochemie blieben jedoch negativ (siehe „Ergebnisse“ und „Diskussion“).

Die α -Defensin-Expression durch humane Adipozyten des Omentums (und der Subkutis) stellt einen weiteren Hinweis bezüglich der Bedeutung von Adipozyten in der primären Abwehr gegen bakterielle Infektionen dar.

9. Literaturverzeichnis

Agerberth B, Lee J, Bergmann T, et al. Amino acid sequence of PR-39: isolation from pig intestine of a new member of the family of proline-arginine-rich antibacterial peptides. *Eur J Biochem* 1991;202:849–54

Ailhaud, G., P. Grimaldi und R. Negrel. 1992. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Ann. Rev. Nutr.* 12:207-233

Allgöwer, M., Harder, F., Holander, L. F., Peiper, H.-J., Siewert, J. R. in: *Chirurgische Gastroenterologie*, Springer Berlin-Heidelberg-New York 1981, S.: 1076-1078

Arnljots, K. , Sorensen, O. , Lollike, K. & Borregaard, N. Timing, targeting and sorting of azurophil granule proteins in human myeloid cells. *Leukemia* 12, 1789-1795 (1998)

Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A. and Struhl K. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York

Ayabe, T. et al. Secretion of microbicidal α -defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nature Immunol.* 1, 113-118. (2000)

Bals R, Goldman MJ, Wilson JM. Mouse beta-defensin 1 is a salt-sensitive antimicrobial peptide present in epithelia of the lung and urogenital tract. *Infect Immun* 1998;66:1225–32

Bals R, Wattler S, Nehls M, et al. Mouse beta-defensin 3 is a regulated antimicrobial peptides expressed in mucosal organs. *Infect Immun* 1998;67:3542–7

Bals R, Wang X, Wu Z, et al. Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J Clin Invest* 1998;102:874–80

Bals R, Weiner DJ, Meegalla RL, et al. Transfer of a cathelicidin peptide antibiotic gene restores bacterial killing in a cystic fibrosis xenograft model. *J Clin Invest* 1998;103:1113–7

Bals R, Weiner D, Moscioni A, et al. Augmentation of innate host defense by expression of a cathelicidin antimicrobial peptide. *Infect Immun* 1999;67:6084–9

Bateman, A. et al. The isolation and characterization of a novel corticostatin/defensin-like peptide from the kidney. *J. Biol. Chem.* 271,10654-10659 (1996)

Bdeir K., Cane W., Canziani G., Chaiken I., Weisel J., Koschinsky M.L., Lawn R.M., Bannerman P.G., Sachais B.S., Kuo A., Hancock M.A., Tomaszewski J., Raghunath P.N., Ganz T., Higazi A.A., Cines D.B. Defensin promotes the binding of lipoprotein (a) to vascular matrix, *Blood*, 94:2007-2019,(1999)

Bevins CL, Jones DE, Dutra A, et al. Human enteric defensin genes: chromosomal map position and a model for possible evolutionary relationships. *Genomics* 1996;31: 95–106

Biragyn, A. et al. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by β -defensin2. *Science* 298, 1025-1029. (2002)

Boman H. Antibacterial peptides: key components needed in immunity. *Cell* 1991;65:205–7

Charlet M, Chernysh S, Philippe H, et al. Innate immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. *J Biol Chem* 1996;271:21808–13

Chavakis T., Cines D.B., Rhee J.S., Liang O.D., Schubert U., Hammes H.P., Higazi A.A., Nawroth P.P., Preissner K.T., Bdeir K. Regulation of neovascularization by human neutrophil peptides (alpha-defensins): a link between inflammation and angiogenesis, *FASEB J.*, 18:1306-1308,(2004)

Chertov, O. et al. Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J. Biol. Chem.* 271, 2935-2940 (1996)

Chomczynski P. and Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159

Church G. M. and Gilbert W. (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 1991-1995

Cole, A. M. et al. ; Retrocyclin : a primate peptide that protects cells from infection by T-and M-tropic strains of HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 1813-1818 (2002)

Cowland, J. B. & Borregaard, N. The individual regulation of granule protein mRNA levels during neutrophil maturation explains the heterogeneity of neutrophil granules. *J. Leukoc. Biol.* 66, 989-995 (1999)

Daher, K. A., Selsted, M. E. & Lehrer, R. I.; Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins; *J. Virol.* 60, 1068-1074 (1986)

Daher, K. A. , Lehrer, R. I. , Ganz, T. & Kronenberg, M. Isolation and characterization of human defensin cDNA clones. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 7327-7331 (1988)

Dziri C, Paquet JC, Hay JM, Fingerhut A, Msika S, Zeitoun G, Sastre B, Khalfallah T: Omentoplasty in the prevention of deep abdominal complications after surgery for hydatid

disease of the liver: a multicenter, prospective, randomized trial. French Associations for Surgical Research. J Am Coll Surg 188:281-289, 1999

Evans, E. W., Beach, G. G., Wunderlich, J. & Harmon, B. G. Isolation of antimicrobial peptides from avian heterophils J. Leukoc. Biol. 56, 661-665 (1994)

Fearon D, Locksley R. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. Science 1996;272:50-4

Fehlbaum P, Rao M, Zasloff M, Anderson GM. An essential amino acid induces epithelial beta-defensin expression. Proc Natl Acad Sci USA 2000 Nov 7;97 (23): 12723-8

Feinberg A. P. and Vogelstein B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal Biochem 132, 6-13

Fried S, Bunkin D & Greenberg A. 1998. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 83;847-850

Friedman, J. M. und J. L. Hallas. 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. Nature 395:763-770

Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, et al. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. J Biol Chem 1997;272:15258-63

Fujii, G. , Selsted, M. E. & Eisenberg, D. Defensins promote fusion and lysis of negatively charged membranes. Protein Sci. 2, 1301-1302 (1993)

Gainsford T, Willson T, Metcali D, Handman E, McFarlane C, Ng A, Nicola NA, Alexander WS & Hilton DJ. 1996. Leptin can induce proliferation, differentiation and functional activation of hemopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 93;14564-14568

Gallo R, Ono M, Povsic T, et al. Syndecans, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:11035-9

Ganz, T et al. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 76, 1427-1453 (1985)

Ganz T, Metcalf J, Gallin J, et al. Microbicidal/cytotoxic proteins of neutrophils are deficient in two disorders: Chediak-Higashi syndrome and “specific” granule deficiency. *J Clin Invest* 1988;552-6

Ganz T, Lehrer RI. Defensins. *Curr Opin Immunol* 1994;6:584-9

Ganz T, Lehrer RI. Defensins. *Pharmac Ther* 1995;66: 191-205

Ganz T, Weiss J. Antimicrobial peptides of phagocytes and epithelia. *Semin Hematol* 1997;34:343-54

Garcia, J. R. et al. Human β -defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J.* 15, 1819-1821 (2001)

Ghosh, D. et al. Paneth cell trypsin is the processing enzyme for human defensin-5. *Nature Immunol.* 3, 583-590 (2002)

Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, et al. Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* 1997;88:553–60

Gough M, Hancock RE, Kelly NM. Antiendotoxin activity of cationic peptide antimicrobial agents. *Infect Immun* 1996;64:4922–7

Gudmundsson GH, Agerberth B, Odeberg J, et al. The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *Eur J Biochem* 1996;238:325–32

Hancock REW. Peptide antibiotics. *Lancet* 1997; 349:412–22

Harder J, Bartels J, Christophers E, et al. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 1997;387:861

Harder, J. et al. Mapping of the gene encoding human β -defensin-2 (DEFB2) to chromosome region 8p22-p23.1. *Genomics* 46, 472-475 (1997)

Harwig, S. S. , Park, A. S. & Lehrer, R. I. Characterization of defensin precursors in mature human neutrophils. *Blood* 79, 1532-1537 (1992)

Hiemstra P, van Wetering S, Stolk J. Neutrophil serine proteinases and defensins in chronic obstructive pulmonary disease: effects on pulmonary epithelium. *Eur Respir J* 1998;12:1200–8

Higazi A.A., Ganz T., Kariko K., Cines D.B. DEfensin modulates tissue-type plasminogen activator and plasminogen binding to fibrin and endothelial cells, *J. Biol. Chem.*, 271:1750-1765, (1996)

Higazi A.A., Lavi E., Bdeir K., Ulrich A.M., Jamieson D.G., Rader D.J., Usher D.C., Kane W., Ganz T., Cines D.B. Defensin stimulates the binding of lipoprotein (a) to human vascular endothelial and smooth muscle cells, *Blood*, 89:4290-4298,(1997)

Hirata M, Zhong J, Wright SC, et al. Structure and functions of endotoxin-binding peptides derived from CAP18. *Prog Clin Biol Res* 1995;392:317–26

Hiratsuka T, Nakazato M, Date Y, Ashitani J, Minematsu T, Chino N, et al. Identification of human β -defensin-2 in respiratory tract and plasma and is increased in bacterial pneumonia. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;249:943-7

Hristova K, Selsted ME, White SH. Critical role of lipid composition in membrane permeabilization by rabbit neutrophil defensins. *J Biol Chem* 1997;272:24224–33

Huang H-J, Ross C, Blecha F. Chemoattractant properties of PR-39, a neutrophil antibacterial peptide. *J Leukoc Biol* 1997;61:624–9

Huang, H. W. Action of antimicrobial peptides: two state model. *Biochemistry* 39, 8347-8352 (2000)

Isomoto H, Mukae H, Ishimoto H, Nishi Y, Wen CY, Wada A, Ohnita K, Hirayama T, Nakazato M, Kohno S. High concentrations of human beta-defensin 2 in gastric juice of patients with *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol*. 2005 Aug 21;11(31):4782-7

Jequier, E. und L. Tappy. 1999. Regulation of body weight in humans, *Physiol. Rev.* 79:451-480

Joiner, K. A. , Ganz, T. , Albert, J. & Rotrosen, D. The opsonizing ligand on *Salmonella*

typhimurium influences incorporation of specific, but not azurophil, granule constituents into neutrophil phagosomes. *J. Cell Biol.* 109, 2771-2772 (1989)

Jones DE, Bevins CL. Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *J Biol Chem* 15;267(32):23216-25, 1992

Jurevic, R. J. , Bai, M. , Chadwick, R. B. , White, T. C. & Dale, B. A. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in human β -defensin 1: high-throughput SNP assays and association with candida in type I diabetics nad nondiabetic controls. *J. Clin. Microbiol.* 41, 90-96 (2003)

Kagan, B. L. , Selsted, M. E. , Ganz, T. & Lehrer, R. I. Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87,210-214 (1990)

Kalfa VC, Brogden KA. Anionic antimicrobial peptide-lysozyme interactions in innate pulmonary immunity. *Int J Antimicrob Agents* 1999;13:47–51

Kern, P. A., M. Saghizadeh, J. M. Ong, R. J. Bosch, R. Deem und R. B. Simsolo. 1995. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J. Clin. Invest.* 95:2111-2119)

King AE, Fleming DC, Critchley HO, Kelly RW. Differential expression of the natural antimicrobials, beta-defensins 3 and 4, in human endometrium. *J Reprod Immunol.* 2003 Jun;59(1):1-16

Kokryakov, V. N. et al. Protegrins : leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins. *FEBS Lett.* 327, 231-236 (1993)

Larrick J, Hirata M, Balint R, et al. Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect Immun* 1995;63:1291–7

Latham PW. Therapeutic peptides revisited. *Nat Biotechnol* 1999;17:755–7

Lehrer, R. I., Daher, K., Ganz, T. & Selsted, M. E.; Direct inactivation of viruses by MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics from rabbit leukocytes; *J. Virol.* 54, 467-472 (1985)

Lehrer, R. I., Ganz, T., Szklarek, D. & Selsted, M. E.; Modulation of the in vitro candidacidal activity of human neutrophil defensins by target cell metabolism and divalent cations; *J. Clin. Invest.* 81, 1829-1835, (1988)

Lehrer, R. L. et al. Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bacterial activity. *J. Clin. Invest.* 84, 553-561, (1989)

Lehrer R, Ganz T, Selsted M. Defensins: endogenous antibiotic peptides of animal cells. *Cell* 1991;229–30.

Lehrer R, Ganz T. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defense. *Curr Opin Immunol* 1999;11: 23–7

Lehrer, R. I. & Ganz, T. Cathelicidins: a family of endogenous antimicrobial peptides. *Curr. Opin. Hematol.* 9, 18-22 (2002)

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, et al. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle*/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996;86:973–83

Lencer, W. L. et al. Induction of epithelial chloride secretion by channel-forming cryptidins 2

and 3. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 8585-8589. (1997)

Levine J, Jensen M, Eberhardt N & O'Brien T. 1998. Adipocyte macrophage colony-stimulating factor is a mediator of adipose tissue growth. Journal of Clinical Investigation 101;1557-1564

Li J, Post M, Volk R, et al. PR39, a peptide regulator of angiogenesis. Nat Med 1999;6:49-55

Lichtenstein, A., Ganz, T., Selsted, M. E. & Lehrer, R. I.; In vitro tumor cell cytotoxicity mediated by peptide defensins of human and rabbit granulocytes; Blood 68, 1407-1410 (1986)

Lichtenstein, A. K., Ganz, T., Nguyen, T. M., Selsted, M. E. & Lehrer, R. I.; Mechanism of target cytotoxicity by peptide defensins. Target cell metabolic activities, possibly involving endocytosis, are crucial for expression of cytotoxicity; J. Immunol. 140, 2686-2694 (1988)

Lichtenstein, A. Mechanism of mammalian cell lysis mediated by peptide defensins. Evidence for an initial alteration of the plasma membrane. J. Clin. Invest. 88, 93-100 (1991)

Linzmeier, R., Ho, C. H., Hoang, B. V. & Ganz, T. A. 450-kb contig of defensin genes on human chromosome 8p23. Gene 233, 205-211 (1999)

Liu, L. & Ganz, T. The pro region of human neutrophil defensin contains a motif that is essential for normal subcellular sorting. Blood 85, 1095-1103 (1995)

Liu, L., Zhao, C., Heng, H. H. Q. & Ganz, T. The human β -defensin-1 and α -defensins are encoded by adjacent genes: two peptide families with differing disulfide topology share α common ancestry. Genomics 43, 316-320 (1997)

Liu, L. et al. Structure and mapping of the human β -defensin HBD-2 gene and its expression at sites of inflammation. *Gene* 222, 237-244 (1998)

Liu, L. , Roberts, A. A. & Ganz, T. By IL-1 signaling, monocyte-derived cells dramatically enhance the epidermal antimicrobial response to lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 170, 575-580 (2003)

Lohner K, Latal A, Lehrer RI, et al. Differential scanning microcalorimetry indicates that human defensin, HNP-2, interacts specifically with biomembrane mimetic systems. *Biochemistry* 1997;36:1525–31

Lord G, Matarese G, Howard J, Baker R, Bloom R & Lechler R. 1998. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 394;897-901

Lysenko ES, Gould J, Bals R, et al. Bacterial phosphorylcholine decreases susceptibility to the antimicrobial peptide LL-37/hCAP18 expressed in the upper respiratory tract. *Infect Immun* 2000;68:1664–71

MacLeod, R. J. et al. Corticostatic peptides cause nifedipine-sensitive volume reduction in jejunal villus enterocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 552-556 (1991)

Maget-Dana R, Ptak M. Penetration of the insect defensin A into phospholipid monolayers and formation of defensin A-lipid complexes. *Biophys J* 1997;73:2527–33

Marquardt, H., Todaro, G. J. & Twardzik, D. R. Snake venom growth arresting peptide. US patent 4774318-A 3 (1988)

Masłowska, M., T. Scantlebury, R. Germinario und K. Cianflore. 1997. Acute in vitro production of acylation stimulating protein in differentiated human adipocytes. *J. Lipid. Res.* 38:1-11

Matsui, H. et al. Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell* 95,1005-1015 (1998)

Matsushita, L. et al. Genetic variants of human β -defensin-1 and chronic obstructive pulmonary disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291,17-22. (2002)

Matsuzaki, K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self defence? *Biochem. Soc. Trans.* 29, 598-601 (2001)

Matzinger P. An innate sense of danger. *Semin Immunol* 1998;10:399–415

McGray JPB, Bentley L. Human airway epithelia express a β -defensin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;16:343-9

Medzhitov R, Janeway C. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997;91: 295–8

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway C. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394–7

Merlin, D. , Yue, G. , Lencer, W. L. , Selsted, M. E. & Madara, J. L. Cryptdin-3 induces novel apical conductance(s) in Cl-secreting, including cystic fibrosis, epithelia. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280, C296-C302 (2001)

Michaelson, D. , Rayner, J. , Couto, M. & Ganz, T. Cationic defensins arise from charge-neutralized properdides: a mechanism for avoiding leukocyte autotoxicity? *J. Leukoc. Biol.* 51, 634-639 (1992)

Mohamed-Ali, V., J. H. Pinkney und S. W. Coppack. 1998. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int. J. Obes.* 22:1145-1158

Morrison GM, Davidson DJ, Kilanowski FM, et al. Mouse beta defensin-1 is a functional homolog of human beta defensin-1. *Mammal Genome* 1998;9:453–7

Morrison G, Davidson D, Dorin J. A novel mouse beta defensin, Defb2, which is upregulated in the airways by lipopolysaccharide. *FEBS Lett* 1999;442:112–6

Morrison, G. , Kilanowski, F. , Davidson, D. & Dorin, J. Characterization of the mouse β -Defensin 1, Defb 1, mutant mouse model. *Infect. Immun.* 70, 3053-3060 (2002)

Moser, C. et al. β -Defensin 1 contributes to pulmonary innate immunity in mice. *Infect. Immun.* 70,3068-3072 (2002)

Oualette, A. J. et al. Developmental regulation of cryptdin, a corticostatin/defensin precursor mRNA in mouse small intestinal crypt epithelium. *J. Cell Biol.* 108, 1687-1695 (1989)

Papo N., Shai Y. Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. *Cell Mol Life Sci* 2005 Apr;62(7-8):784-90

Pardi, A. , Zhang, X. L. , Selsted, M. E. , Skalicky, J. & Yip, P, F, NMR studies of defensin antimicrobial peptides. 2. Three-dimensional structures of rabbit NP-2 and human HNP-1.

Biochemistry 31, 11357-11364 (1992)

Peake P, O'Grady S, Pussel B & Charlesworth J. 1997. Detection and quantification of the control proteins of the alternative pathway of the complement in 3T3-L1 adipocytes. *European Journal of Clinical Investigation* 27: 922-927

Peschel A, Otto M, Jack R, et al. Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem* 1999;274:8405-10

Rice, W. G. et al. Defensin-rich dense granules of human neutrophils. *Blood* 70, 757-765 (1987)

Rodbell M. Metabolism of Isolated Fat Cells. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 239, No 2, February 1964, 375-380

Salzman, N. H. , Ghosh, D. , Huttner, K. M. , Paterson, Y. & Bevins, C. L. Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature* 422, 522-526 (2003)

Schittek, B. et al. Dermcidin. A novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nature Immunol.* 2, 1133-1137 (2001)

Schling, P., H. Mallow, A. Trindl und G. Löffler. 1999. Evidence for a local renin angiotensin system in primary cultured human preadipocytes. *Int. J. Obes.* 23:336-341

Schneider JJ, Unholzer A, Schaller M, Schafer-Korting M, Korting HC. Human defensins. *J Mol Med.* 2005 Aug;83(8):587-95. Epub 2005 Apr 9. Review

Schonwetter, B. S. , Stolzenberg, E. D. & Zasloff, M. A. Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation. *Science* 267,1645-1648 (1995)

Selsted, M. E., Szklarek, D. & Lehrer, R. I.; Purification and antibacterial activity of antimicrobial peptides of rabbit granulocytes; *Infect. Immun.* 45, 150-154, (1984)

Selsted, M. E., Szklarek, D., Ganz, T. & Lehrer, R. I.; Activity of rabbit leukocyte peptides against *Candida albicans*; *Infect. Immun.* 49, 202-206, (1985)

Sewter C P, Digby J E, Blows F, Prins J and O’Rahilly S. Regulation of tumour necrosis factor- α release from human adipose tissue in vitro. *Journal of Endocrinology* (1999) 163, 33-38)

Shafer WM, Qu X, Waring AJ, et al. Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:1829–33

Shai, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helikal antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1462, 55-77 (1999)

Shi J, Ross C, Chengappa M, et al. Identification of a proline-arginine-rich antibacterial peptide from neutrophils that is analougous to PR-39, an antimicrobial pep-tide from the small intestine. *J Leukoc Biol* 1994; 56:807–11

Singh P, Jia H, Wiles K, et al. Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:14961–6

Smith, J. J. , Travis, S. M. , Greenberg, E. P. & Welsh, M. J. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* 85, 229-236 (1996)

Solomon, S. et al. Corticostatic peptides. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 40, 391-398 (1991)

Soong L, Ganz T, Ellison A, et al. Purification and characterization of defensins from cystic fibrosis sputum. *Inflamm Res* 1997;46:98–102

Sorensen, O. E. et al. Wound healing and expression of antimicrobial peptides / polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors. *J. Immunol.* 170, 5583-5589 (2003)

Spicer, S. S., Staley, M. W., Wetzel, M. G. & Wetzel, B. K. Acid mucosubstance and basic protein in mouse Paneth cells. *J. Histochem. Cytochem.* 15, 225-242 (1967)

Steppan, C. M., S. T. Bailey, S. Bhat, E. J, Brown, R. R. Banerjee, C. M. Wright, H. R. Patel, R. S. Ahima und M. A. Lazar. 2001. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409:307-312

Sun L, Finnegan CM, Kish-Catalone T, Blumenthal R, Garzino-Demo P, La Terra Maggiore GM, Berrone S, Kleinman C, Wu Z, Abdelwahab S, Lu W, Garzino-Demo A. Human beta-defensins suppress human immunodeficiency virus infection: potential role in mucosal protection. *J Virol.* 2005 Nov;79(22):14318-29

Territo, M. C. , Ganz, T. , Selsted, M. E. & Lehrer, R. Monocyte-chemotactic of defensins from human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 84,2017-2020 (1989)

Tomonaga, T. et al. Effects of corticostatin-I on rat adrenal cells in vitro. *J. Endocrinol.* 125,287-297 (1991)

Trayhurn, P. 1996. Uncoupling protein in brown adipose tissue: molecular differentiation of the adipose tissues. *Biochem. Soc. Trans.* 24:402-406

Tsutsumi-Ishii, Y. & Nagaoka, I. Modulation of human β -defensin-2 transcription in pulmonary epithelial cells by lipopolysaccharide-stimulated mononuclear phagocytes via proinflammatory cytokine production. *J. Immunol.* 170, 4226-4236 (2003)

Van Wetering, S. et al. Effect of defensins on interleukin-8 synthesis in airway epithelial cells; *Am. J. Physiol.* 272, L888-L896 (1997)

Valore, E. V. & Ganz, T. Posttranslational processing of defensins in immature human myeloid cells. *Blood* 79, 1538-1544 (1992)

Valore, E. V. , Martin, E. , Harvig, S. S. & Ganz, T. Intramolecular inhibition of human defensin HNP-1 by its propeptide. *J. Clin. Invest.* 97, 1624-1629 (1996)

Valore EV, Park CH, Quayle AJ, Wiles KR, McGray PBJ, Ganz T. Human β -defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest* 1998;101:1633-42

Vargemezis V, Thodis. Prevention and management of peritonitis and exit-site infection in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2001 16, 106-108

Verkman, A. S. , Song, Y & Thiagarajah, J. R. Role of airway surface liquid and submucosal glands in cystic fibrosis lung disease. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284, C2-C15 (2003)

Yamaguchi Y, Nagase T, Makita R, Fukuhara S, Tomita T, Tominaga T, Kurihara H, Ouchi Y. Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoforms in humans and mice. *J Immunol.* 2002 Sep 1;169(5):2516-23

Yang, D. et al. β -defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T-cell CCR6, *Science* 286, 525-528 (1999)

Yang, D. , Chen, Q. , Chertov, O. & Oppenheim, J. J. Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J. Leukoc. Biol* 68, 9-14 (2000)

Yang R-B, Mark M, Gray A, et al. Toll-like receptor 2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signaling. *Nature* 1998;395:284–8

Yount, N. Y. et al. Rat neutrophil defensins. Precursor structures and expression during neutrophilic myelopoiesis. *J. Immunol.* 155, 4476-4484 (1995)

Walker, F. C., Rogers, A. W. The greater omentum as a site of antibody synthesis. *Br. Exp. Pathol.* (1961) 22, 222-231

Wang, W. , Cole, A. M. , hong, t., Waring, A. J. & Lehrer, R. I. Retrocyclin, an antiretroviral θ -defensin, is a lectin. *J. Immunol.* 170, 4708-4716 (2003)

Wehlkamp J., Fellermann K., Herrlinger KR., Bevins CL., Stange EF. Mechanisms of disease: defensins in gastrointestinal diseases. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005 Sep;2(9):406-15

Wilson, C. L. et al. Regulation of intestinal α -defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science* 286, 113-117 (1999)

Wimley, W. C. , Selsted, M. E. & White, S. H. Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. *Protein Sci.* 3, 1362-1373 (1994)

Wine, J. J. The genesis of cystic fibrosis lung disease. *J. Clin. Invest* 103,309-312 (1999)

Zanetti, M. , Gennaro, R. & romeo, D. Gathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C- terminal antimikrpbial domain. FEBS Lett. 374, 1-5 (1995)

Zasloff M. Antibiotic peptides as mediators of innate immunity. Curr Opin Immunol 1991;4:3–7

Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature 2002 415: 389-395

Zhang, H. et al.; Neutrophil defensins mediate acute inflammatory response and lung dysfunction in dose-related fashion ; Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 280, L947-L954 (2001)

Zhao CQ, Wang I, Lehrer RI. Widespread expression of beta-defensin HBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. FEBS Lett 1996;396:319-22

Zhu, Q. Z. , Singh, A. V. , Bateman, A. , Esch, F. & Solomon, S. The corticostatic (anti-ACTH) and cytotoxic activity of peptides isolated from fetal, adult and tumor-bearing lung. J. Steroiid. Biochem. 27, 1017-1022 (1987)

Zhu, Q. , Bateman, A. , Sighn, A. & Solomon, S. Isolation and biological activity of corticostatic peptides (anti-ACTH). Endocr. Res. 15, 129-149 (1989)

Diese Arbeit hat auf Grund der spannenden Fragestellung den 1. Preis beim „Nephrologischen Forum“ gewonnen, einen junge Wissenschaftler fördernden überregionalen Wettbewerb.

10. Lebenslauf

Name: Georgios Paslakis
Staatsangehörigkeit: griechisch/deutsch

Persönliche Angaben: Geburtsdatum: 17.02.1978
Geburtsort: Thessaloniki, Griechenland

Schulbildung: 1983-1989 Grundschule Thessaloniki
1989-1995 Deutsche Schule Thessaloniki (vom deutschen Staat unterstütztes Gymnasium mit Unterricht in griechischer und deutscher Sprache)
1995 griechische Abschlussprüfung und deutsches Abitur

Studium: 06.11.1996 Test für Mediziner
01.05.1997 Beginn des Studiums
23.03.1999 Physikum
23.03.2000 1. Staatsexamen
11.04.2002 2. Staatsexamen
08.05.2003 3. Staatsexamen
Praktisches Jahr: 15.04.-04.08.2002 Innere Medizin (Medizin. Poliklinik), 05.08.-24.11.2002 Chirurgie (Chirurg. Klinik Innenstadt), 25.11.2002-16.03.2003 Psychiatrie (Psychiatr. Klinik Innenstadt)

Klinische Tätigkeit: 01.06.-31.12.2003: Arzt im Praktikum im Institut für Klinische Biochemie der LMU München
01.02.-30.09.2004: Arzt im Praktikum auf der Demenzfachstation der Psychiatrischen Klinik der LMU München
01.04.2005-aktuell: Stationsarzt der Suchtstation im Zentralinstitut für Seelische Gesundheit, Mannheim